

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CUBIERTAS CON  
QUITOSANO SOBRE MUERTE CELULAR EN LAS LÍNEAS  
LEUCÉMICAS K562 Y JURKAT**

**POR**  
**MARTÍN GERARDO GARCÍA JUÁREZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**ENERO, 2017**

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CUBIERTAS CON  
QUITOSANO SOBRE MUERTE CELULAR EN LAS LÍNEAS  
LEUCÉMICAS K562 Y JURKAT**

Comité de Tesis



---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**

Director de tesis



---

**Dra. Ana Carolina Martínez Torres**

Secretario



---

**Dra. Diana Zárate Triviño**

Vocal



---

**Dr. Moisés Armides Franco Molina**

Vocal



---

**Dr. Edgar Gamboa Mendoza**

Vocal

**EFFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO CUBIERTAS CON  
QUITOSANO SOBRE MUERTE CELULAR EN LAS LÍNEAS  
LEUCÉMICAS K562 Y JURKAT**

**Dirección de tesis**

**Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Virología y  
fue dirigido por la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y co-dirigido por la Dra.  
Ana Carolina Martínez Torres**



---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**

Director de tesis



---

**Dra. Ana Carolina Martínez Torres**

Co-director de tesis

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de investigación (Tesis) se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Gracias a la Dra Cristina por darme la oportunidad de entrar en el laboratorio de Inmunología, por permitirme comenzar este proyecto y la oportunidad de iniciar mi camino como futuro investigador.

Gracias a la Dra Ana Carolina Martínez ya que sin ella no hubiera podido realizar este trabajo, le agradezco por lo mucho que me enseñó, por sus clases, por su tiempo, por los regaños, por la crítica, por la presión, por los malos ratos, por los buenos ratos, por permitirme abrir mi panorama, por hacerme saber que no puedo confiar en mi cabeza, por ayudarme a darme cuenta de mis errores, por hacerme ver mi rebeldía, por enseñarme a redactar, a ver mi mediocridad, por expandir mis limitantes, por dimensionarme, guiarme, por recordarme que lo que sé tan sólo es un poco de todo lo que existe en el abismo de lo desconocido, por enseñarme que debo aprender a realizar los cuestionamientos oportunos, a observar, a buscar, que debo saber más de lo que necesito, no dejar de leer, no dejar de ser curioso, que no importa si las condiciones no son favorables aun así puedes sacar los resultados, por enseñarme a ser independiente, por eso y más cosas, muchas gracias.

Gracias a la Dra Diana Zarate Triviño, sin usted creo que no hubiera sobrevivido emocionalmente, le agradezco por la tardes de consejos, de apoyo, por enseñarme a dejar de ser tan iluso, a enfocar los cuestionamientos, a no dejar la literatura fuera de mi vida, gracias por ayudarme a comprender la importancia de los libros, retomar y puntualizar mi amor por la cultura, por permitirme encontrarme a mí, fuera y dentro, y en especial le quiero agradecer por hacerme ver que un día, quiera o no, voy a morir; gracias a usted entendí que todos sabemos que la muerte existe, pero no la vemos como real, la ignoramos, la esquivamos, queremos hacer como si no fuera a pasar, la

muerte como olvido, representación y final, como requisito, como objeto de lo real inamovible, como resistencia. Sin usted no habría comprendido la vida auténtica.

Gracias al Dr. Moisés Armides Franco por enseñarme que lo que sé no es suficiente, que uno no puede estar seguro de lo que hace, que uno cree que sabe algo pero no sabe nada, o no lo sabe bien, que uno no puede dar un hecho por sentado, por enseñarme a preguntar, a criticar, a no creerle a nadie, a pensar más allá, a leer el contexto y trasfondo, por sus preguntas y consejos, sobre todo gracias por su amistad.

Gracias a William por enseñarme a pipetear, a sembrar, a trabajar en un laboratorio, gracias por ayudarme a salvar la tesis. Gracias por ayudarme a intentar hacer ejercicio, por las tardes de rap, por la diversión, la compañía, gracias por ser un excelente amigo.

Gracias a la gente del laboratorio Baldo, Luis Gómez, Andrea, Helen, Abi, Fer, Michel, el poderoso Kenny, Ashanti, Myr, Mile, Zugeeissy, Lili, Tadeo, Omar... ¿no me falta nadie?, ¡Ah!... Carito y el anteproyecto.

Gracias a mi compañeros de maestría, Armenta, Leo, Zyanya, Jenny, David Corro. También a Erika, Carmen, Silvia, Ivonne, Claudia, Juanjo y Erick que sin ustedes ni de chiste acabo la tesis, me tuvieron demasiada paciencia y me brindaron mucha ayuda en bastantes cosas.

Gracias a Yaris por ser mi amiga desde hace casi 9 años, gracias por todos los cafés, por tu ayuda cuando le expuse en inglés a Caro, la comida que me llevabas cuando no tenía dinero, los lonches, las historias, gracias por ayudarme con mi tesis.

Karla gracias por salvarme de morir de hambre cuando me llevaste comida, por recordarme la fecha de cumpleaños y por salvarme de morir ahogado.

Bena, gracias por tu ayuda en los experimentos y por ser un gran amigo, de los pocos con los que puedo hablar largo y tendido, de los pocos en los que confío, gracias por todo champs.

Gracias a Lic. María de Jesús, Hiram Vázquez, María Laura, Saúl Maldonado, Melisa Puente, Kenya Marisol Coxis, Mister y Nibus.

Gracias a mi compañera Daniela Mata, quien siempre me hizo dietas y nunca las seguí, además de que fue mala consejera y nunca me ayudó con las cosas emocionales, aprendí mucho de ti. Te quiero.

A mi mejor amiga Fernanda, una persona que amo por muchas razones, gracias por siempre estar ahí, gracias por los cinco mil pesos que todavía no termino de pagarte, por todas las cosas que vivimos juntos, por las historias, las aventuras, momentos que nunca se me van a olvidar. Te quiero.

A mi amigo Luis Zacarías, ¿qué puedo decirte? Gracias por tu amistad, gracias por todas esas historias, todo lo que sobrellevamos juntos, todas esas aventuras, espero que sigamos siendo como siempre, aunque nos veamos menos, espero que sea de las amistades que duren. Te quiero.

A mi novia Nancy, gracias por ser tan interesante, linda, tierna, culta, inteligente y hermosa, por estar conmigo, por apoyarme, por aguantarme, por comprenderme, por esos abrazos, por ese cariño, por todo ese amor. ¡Te amo!

También quisiera agradecer a mis padres y mi hermana porque sin ellos y su amor no sería todo lo que soy e intento ser, por apoyarme de un sinfín de formas durante estos cinco semestres y todo lo que tengo de vida, por sus consejos, abrazos y regaños, por darme la oportunidad de seguir preparándome, por darme el ejemplo y las herramientas para ser una mejor versión de mí. Ustedes son lo mejor que tengo y estoy muy orgulloso de que sean mi familia. Simplemente los amo.

Finalmente gracias al citómetro, realmente sin él nada de esto hubiera sido posible.

Je est un autre. Tant pis pour le bois qui se trouve violon,  
et nargue aux inconscients, qui ergotent sur ce qu'ils ignorent tout à fait!

-Arthur Rimbaud

No quisiera ser feliz a condición de ser imbécil... Y no obstante -decía yo-, hay una escandalosa contradicción en esta manera de pensar; porque, al fin y al cabo, ¿de qué se trata? De ser feliz. ¿Qué importa tener talento o ser necio? Todavía hay más: los que están satisfechos de cómo son, están muy seguros de estar satisfechos; los que razonan, no están tan seguros de razonar bien. Está, pues, bien claro -decía yo- que habría que aspirar a no tener sentido común, por poco que éste sentido común contribuya a nuestra infelicidad.

-Voltaire, Historia de un buen brahmín.

No man is an Iland, intire of itselſe; every man is a peece of the Continent,  
a part of the maine; if a Clod bee washed away by the Sea, Europe is the  
leſſe, as well as if a Promontorie were, as well as if a Manor of thy friends  
or of thine owne were; any mans death diminishes me, because I am  
involved in Mankinde; And therefore never ſend to know for whom the  
bell tolls; It tolls for thee.

## MEDITATION XVII

Devotions upon Emergent Occasions

John Donne

## DEDICATORIA

*Para mis padres; Martín, Rosario y mi hermana Sismahi*

*Para Narcy*

*Para Saúl*

*Para Willy*

*Para Caro, Diana, Moi, Baldo, Yaris, Fer, Luis, Bena, Karla y Dani*

*Para los fantasmas que recorren mi cabeza, los muertos y las voces que no me dejan escuchar el silencio, que encierran lo peor de mí, al mediocre y falso. El eco de ego, mi narcisismo, id, Yo, Ello y Superyó de esta edad y momento.*

*Para el sin sentido de la vida; como acto de rebeldía a mi naturaleza absurda*

*Para la naturaleza del objeto real y su interpretación con el Yo-Ser como “conozco-conozco, conozco-desconozco, desconozco-desconozco” en su estructura secundaria de lo “sintético”, en una pequeña aproximación al real de lo esencial de las nanoestructuras y las células leucémicas.*

*Para mi muerte, como un preludio a la inmortalidad, un pequeño paso a través de las letras.*



# INDICE

I.	RESUMEN	
II.	INTRODUCCIÓN.....	1
III.	ANTECEDENTES.....	3
3.1	Hematopoyesis.....	3
3.1.1	Mielopoyesis.....	4
3.1.1.1	Eritropoyesis.....	5
3.1.1.2	Granulocitopoyesis.....	5
3.1.1.3	Monocitopoyesis.....	6
3.1.2	Linfopoyesis.....	6
3.1.2.1	Linfocitos T.....	7
3.2	Leucemia.....	8
3.2.1	Leucemia linfoide aguda.....	8
3.2.1.1	Patogénesis ALL de células T.....	9
3.2.2	Leucemia mieloide crónica.....	10
3.2.2.1	Patogénesis CML.....	10
3.3	Tratamientos anti-leucémicos.....	12
3.3.1	Tratamientos ALL.....	12
3.3.2	Tratamiento CML.....	14
3.3.3	Mecanismos de resistencia a las terapias antitumorales.....	15
3.4	Muerte celular.....	16
3.4.1	Clasificación de la muerte celular regulada.....	18
3.4.1.1	Muerte celular dependiente de caspasas.....	20
3.4.1.1.1	Apoptosis.....	24
3.4.1.1.2	Vía intrínseca.....	25
3.4.1.1.3	Vía extrínseca.....	27
3.4.1.1.4	Piroptosis.....	29
3.4.2	Muerte celular independiente de caspasas.....	30
3.4.2.1	Autofagia.....	31
3.4.2.2	Necrosis regulada.....	33

3.4.2.2.1	Necroptosis.....	33
3.4.2.2.2	Vía extrínseca.....	34
3.4.2.2.3	Vía intrínseca.....	35
3.4.3	Muerte celular y cáncer.....	37
3.5	Nanopartículas de oro.....	38
3.5.1	Síntesis.....	38
3.5.2	Uso de nanopartículas de oro y cáncer.....	39
3.5.3	Nanopartículas de oro y su efecto sobre la muerte celular.....	40
3.5.4	Interacción entre AuNP y las células.....	41
3.6	Quitosano.....	43
3.6.1	Aplicaciones del quitosano.....	44
3.6.2	Quitosano y nanopartículas de oro.....	45
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	46
V.	HIPÓTESIS.....	47
VI.	OBJETIVO.....	48
6.1.	Objetivos específicos.....	48
VII.	MÉTODOLOGÍA.....	49
7.1	Síntesis de AuNP cubiertas con quitosano y AuNP de citrato de sodio.....	49
7.2	Caracterización de AuNP cubiertas con quitosano y AuNP de citrato de sodio.....	50
7.3	Vehículos.....	50
7.4	Mantenimiento de la línea celular.....	51
7.5	Extracción de células mononucleares de sangre periférica.....	51
7.6	Ensayos de citometría de flujo.....	52
7.7	Evaluación del efecto de AuNP cubiertas con quitosano sobre la exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana celular.....	52
7.8	Análisis de la muerte celular en células leucémicas k562 y Jurkat tratados con AuNP qts.....	53
7.9	Análisis de la muerte celular en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tratados con AuNP qts.....	54

7.10	Análisis de la muerte celular en células leucémicas y PBMC tratadas con tratados con AuNP qts, AuNP Cs y vehículos.....	54
7.11	Análisis de dependencia de caspasas utilizando un inhibido de caspasas QVD.....	55
7.12	Evaluación del ciclo celular.....	55
7.13	Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante marcaje TMRE.....	56
7.14	Evaluación del efecto de AuNP cubiertas con quitosano sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	57
7.15	Evaluación de la morfología celular.....	57
7.16	Evaluación del efecto de AuNP cubiertas sobre linfocitos estimulados con un mitógeno.....	58
7.17	Evaluación de la dependencia de Caspasas mediante Western Blot.....	58
7.18	Análisis estadístico.....	60

## VIII. RESULTADOS.....61

8.1	Caracterización de nanopartículas cubiertas con quitosano mediante el análisis del plasmón de resonancia, tamaño y potencial Z.....	61
8.2	AuNP cubiertas con quitosano inducen exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana plasmática en células K562 y Jurkat.....	64
8.3	AuNP cubiertas con quitosano tienen baja toxicidad en células sanas.....	65
8.4	AuNP cubiertas con quitosano tienen un mayor efecto citotóxico que vehículos y AuNP de citrato de sodio en células leucémicas.....	66
8.5	Las AuNP cubiertas con quitosano, vehículos y AuNP de citrato de sodio tienen bajo efecto citotóxico en células sanas.....	68

8.6	AuNP cubiertas con quitosano inducen cambios en la morfología de células leucémicas.....	69
8.7	AuNP cubiertas con quitosano no inducen cambios en la morfología de células de sanas.....	70
8.8	AuNP cubiertas con quitosano inducen baja citotoxicidad en células linfoides no tumorales, estimulados con Concanavalina A. ....	71
8.9	AuNP cubiertas con quitosano no inducen arresto en el ciclo celular en células k562 y Jurkat.....	73
8.10	AuNP cubiertas con quitosano inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células leucémicas.....	74
8.11	AuNP cubiertas con quitosano inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células leucémicas.....	75
8.12	AuNP cubiertas con quitosano aumentan la expresión de caspasa 8 en células leucémicas.....	76
8.13	AuNP cubiertas con quitosano inducen muerte celular independiente de caspasas. ....	77
IX.	DISCUSIÓN.....	78
X.	CONCLUSIONES.....	91
XI.	PERSPECTIVAS.....	92
XII.	BIOBLOGRAFIA.....	93
XIII.	RESUMEN BIOGRÁFICO.....	112

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Esquema de tratamiento en pacientes con ALL.....	12
<b>Tabla 2.</b> Fármacos empleados en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda.....	13
<b>Tabla 3.</b> Características morfológicas de los tres principales tipos de muerte celular. ....	20
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de caspasas involucradas en la muerte celular. ....	21
<b>Tabla 5.</b> Tipos de dominio interacción proteína-proteína. ....	22
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de la familia de proteínas Bcl-2. ....	24
<b>Tabla 7.</b> Receptores de muerte y ligandos.....	27
<b>Tabla 8.</b> Tipos necrosis regulada emergentes. ....	36

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hematopoyesis.....	4
<b>Figura 2.</b> Eritropoyesis.....	5
<b>Figura 3.</b> Etapas de maduración de linfocitos T.....	7
<b>Figura 4.</b> Aspectos moleculares de la patogénesis de leucemia mieloide crónica. .....	11
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de Inhibidores de tirosina quinasa.....	14
<b>Figura 6.</b> Principales características de las células cancerosas.....	15
<b>Figura 7.</b> Clasificación de la muerte celular.....	17
<b>Figura 8.</b> Primer artículo publicado sobre muerte celular regulada. ....	19
<b>Figura 9.</b> Estructura de procaspasas. ....	21
<b>Figura 10.</b> Procesos de activación de caspasas.....	22
<b>Figura 11.</b> Estructura y clasificación de la familia Bcl-2. ....	23
<b>Figura 12.</b> Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. ....	26
<b>Figura 13.</b> Activación de Caspasa 8. ....	28
<b>Figura 14.</b> Complejo TNFR1. ....	29
<b>Figura 15.</b> Autofagia. ....	32
<b>Figura 16.</b> Complejo IIa, Complejo IIb (rioptosoma) y necrosoma. ....	35
<b>Figura 17.</b> Tipos de muerte celular y sub tipos de muerte celular. ....	37
<b>Figura 18.</b> Vías de interacción de células y nanopartículas. ....	42
<b>Figura 19.</b> Estructura de la quitina y quitosano.....	44
<b>Figura 20.</b> Análisis de plasmón de resonancia de AuNP. ....	61

<b>Figura 21.</b> Análisis de la distribución de tamaño de AuNP. ....	62
<b>Figura 22.</b> Análisis de la distribución del potencial Z.....	63
<b>Figura 23.</b> Análisis de tamaño y potencial Z de AuNP qts diluidas en medio de cultivo celular RPMI.....	63
<b>Figura 24.</b> Análisis de la muerte celular por citometría de flujo.....	64
<b>Figura 25.</b> Análisis de la muerte celular por citometría de flujo.....	65
<b>Figura 26.</b> Evaluación del efecto citotóxico de AuNP qts en células sanas.....	66
<b>Figura 27.</b> Efecto citotóxico de vehículos y AuNP qts sobre células leucémicas.....	67
<b>Figura 28.</b> Efecto citotóxico de vehículos y AuNP qts sobre células sanas. ....	69
<b>Figura 29.</b> Efecto de AuNP qts sobre la morfología de células leucémicas. ....	70
<b>Figura 30.</b> Efecto de AuNP qts sobre la morfología de células sanas.....	71
<b>Figura 31.</b> Análisis del efecto de AuNP qts sobre células linfoides estimuladas con Concanavalina A.....	72
<b>Figura 32.</b> Análisis del efecto de AuNP qts sobre ciclo celular.....	73
<b>Figura 33.</b> Análisis del efecto de las AuNP qts sobre el potencial de membrana mitocondrial en células leucémicas.....	74
<b>Figura 34.</b> Efecto de las AuNP cubiertas con quitosano sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). ....	75
<b>Figura 35.</b> Figura 33. Análisis de la expresión de caspasa 8, 9, p53 mediante Western Blot.....	76
<b>Figura 36.</b> Análisis de la inhibición de caspasas en células leucémicas tratadas con AuNP qts.....	77

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

K562	Línea celular de leucemia mieloide crónica
Jurkat	Línea celular de leucemia linfoide aguda
CML	Chronic Myeloid Leukemia
ALL	Acute Lymphoid Leukemia
OMS	Organización mundial de la salud
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
DNA	Deoxyribonucleic acid
ACS	American Cancer Society
MCR	Muerte Celular Regulada
MCP	Muerte Celular Programada
MCA	Muerte Celular Accidental
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
AuNP	Nanopartículas de oro
QTS	Quitano
AuNP qts	Nanopartículas de oro cubiertas con quitano
AuNP Cs	Nanopartículas de oro de citrato de sodio
TMRE	Etil Ester Tetrametilrodamina
DCFDA	Diclorofluoresceína diacetato
DCF	2'-7'-diclorofluoresceína
AnnV	Anexina V
PI	Propidium Iodide o Yoduro de propidio



IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
RPMI	Roswell Park Memorial Institute médium
SFB	Suero fetal bovino
FACS	Células marcadas por fluorescencia
NCCD	Comité de Nomenclatura en Muerte Celular
LIV	Laboratorio de Inmunología y Virología
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
CASP	Caspasa
QVD-oPH	<b>(3S)-5-(2,6-Difluorophenoxy)-3-[[ (2S)-3-methyl-1-oxo-2-[(2-quinolinylcarbonyl)amino] butyl] amino]-4-oxo-pentanoic acid hydrate</b>
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
DLS	Dispersión dinámica de luz
PSR	Plasmón de resonancia
PS	Fosfatidilserina
Nm	Nanómetros
UFC	Unidad formadora de colonia
UFC-GM	UFC- Granulocitos- Monocitos
UFC-L	UFC- Linfoide
UFC-EM	UFC- Eritroides - Megacariocítica
HSC	Hematopoietic Stem Cell
TCR	Receptor de linfocitos T

## **I. RESUMEN**

La leucemia es un tipo de cáncer que consiste en la desregulación de los procesos biológicos de las células derivadas de la médula ósea, tanto de linaje linfoide y mieloide. En nuestro país representa un serio problema de salud pública debido a su alta morbilidad y mortalidad especialmente en jóvenes. Se sabe que las terapias convencionales contra este tipo de cáncer son costosas, riesgosas, e inespecíficas, además los pacientes desarrollan altos porcentajes de resistencia, la cual está relacionada con características propias de las células malignas, entre ellas la evasión a la muerte celular inducida por las terapias convencionales. Recientes investigaciones muestran que las nanopartículas de oro (AuNP) y el quitosano poseen actividades biológicas importantes, como lo es un potencial efecto antitumoral. En esta tesis se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de oro cubiertas con quitosano (AuNP qts), se analizó su efecto sobre la muerte celular de dos líneas celulares leucémicas: k562, leucemia mieloide crónica y Jurkat, leucemia linfoide aguda, utilizando como control células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se evaluó la permeabilización de la membrana celular, exposición de fosfatidilserina, morfología de las células, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno, expresión de proteínas pro apoptóticas y respuesta a inhibidores de caspasas. Los resultados obtenidos muestran que las AuNP qts poseen un efecto citotóxico dependiente de tiempo y dosis en las células leucémicas, y una baja toxicidad en células sanas (PBMC). El mecanismo de muerte en células leucémicas inducido por AuNP cubiertas con quitosano (AuNP qts) involucra la pérdida de potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno y no depende de la actividad de caspasas. Los resultados obtenidos en esta tesis abren las puertas a un nuevo diseño de posibles terapias y estrategias para combatir este tipo de cáncer.

## II. ABSTRACT

Leukemia represents a serious health problem around the world. In Mexico it is the main cause of death in young people. It is known that first-line therapies are frequently characterized by affecting normal cells, moreover deregulations in tumor cells, such as their capacity to evade cell death, promote treatment-resistance. This is why, the development of new therapies that can be specific for cancer cells and that can overcome cell death resistance is necessary. Recent studies show that gold nanoparticles (AuNPs) and chitosan possess interesting biological activities including potential antitumor effects; hence, in this this thesis I synthesized and characterized chitosan-capped gold nanoparticles and analyzed their cell-death effect in chronic myeloid leukemia (K562), acute lymphoid leukemia (Jurkat) and healthy control cells (PBMC). I evaluated cell membrane permeabilization, phosphatidylserine exposure, cell morphology, effects on cell cycle, mitochondrial membrane potential, production of reactive oxygen species, expression of proapoptotic proteins as caspase 8, 9 and p53, and response to the pan caspase inhibitor, QVD. The results obtained from this thesis show that chitosan-capped AuNPs are cytotoxic in a dose-dependent manner in leukemia cells, while they show low toxicity on PBMC. In addition, it was observed that the cell death mechanism is regulated and involves loss of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species production, in a caspase-independent manner. Altogether the results obtained in this thesis improve the knowledge of chitosan capped AuNPs as selective cytotoxic agents, and open the way to the design of new pharmacological strategies that include these agents against cancer.

## II. INTRODUCCIÓN

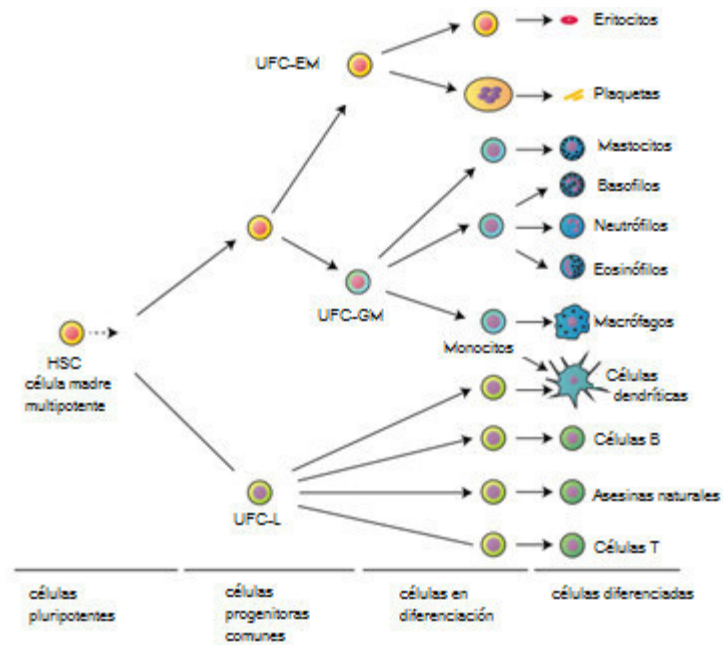
La leucemia es un tipo de cáncer que afecta las células derivadas de la médula ósea. Es una enfermedad de origen multifactorial la cual conlleva a serias repercusiones en la salud pública. Al igual que otros tipos de cáncer, la célula leucémica posee una gran cantidad de características; como lo son una alta tasa de proliferación celular, replicación celular descontrolada, inestabilidad genómica, así como también una resistencia a la muerte celular regulada (Hanahan & Weinberg, 2011). La transformación de subtipos celulares de la sangre en células malignas, conlleva a una pérdida de las condiciones de homeostasis, lo que ocasiona que la cantidad de células malignas aumente y las células sanas residuales disminuyan en número y pierdan parcial o totalmente su función, generando efectos negativos en el sistema inmune (Stringaris et al., 2014). Con base en sus características clínicas y celulares las leucemias pueden ser clasificadas según la población celular afectada y su agresividad. De acuerdo al tipo celular se encuentran aquellas que son derivadas de linaje mieloide o linaje linfoide. En cuanto a la agresividad tenemos las que son de curso agudo y las de curso crónico (Vardiman JW, Thiele J, 2015). En este trabajo de tesis se emplearon células de la línea k562 de leucemia mieloide crónica o CML (Chronic Myeloid Leukemia) y células de la línea Jurkat correspondientes a leucemia linfoide aguda o ALL (Acute Lymphoid Leukemia). Estos tipos de leucemia son de los más importantes debido a que la CML tiene una mayor frecuencia en adultos mayores de 60 años y representa el 15% de los tipos de leucemia (Baccarani et al., 2012; Granatowicz et al., 2015). Por otro lado, la leucemia linfocítica de carácter agudo representa la primera causa de muerte por cáncer en jóvenes menores a 20 años en nuestro país (Guillermo J Ruiz-Argüelles, Guillermo J Ruiz Delgado, 2013; INEGI, 2013). El tratamiento para ambos tipos de leucemia consiste principalmente en el uso combinado de esquemas terapéuticos, donde se utilizan fármacos antineoplásicos, corticosteroides e inhibidores de kinasas, así como el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Granatowicz et al., 2015).

Sin embargo, en los últimos años se ha observado una mayor tasa de reincidencia y resistencia a los fármacos convencionales empleados en el tratamiento contra el cáncer, asociada principalmente a mecanismos característicos de la célula tumoral como lo es la evasión a la muerte celular regulada (Darding & Meier, 2012; Martinez-Torres et al., 2015; Schmidt et al., 2004). Estudios recientes muestran que las nanopartículas de oro (AuNPs) poseen diversas propiedades que les confieren un gran potencial antitumoral, como lo son su marcado efecto citotóxico en células cancerosas y su alta biocompatibilidad con el tejido sano (Baharara, Ramezani, Divsalar, Mousavi, & Seyedarabi, 2016; M. Liu et al., 2013; Selim & Hendi, 2012; Paino, Marangoni, de Oliveira, Antunes, & Zucolotto, 2012). Se ha observado que estas propiedades dependen de características como tamaño, forma, concentración y agente de superficie los cuales están asociados al tipo de síntesis, principalmente al tipo de agente reductor utilizado (Corzo Lucioni, 2012). Por lo que nosotros utilizamos el quitosano, un polisacárido catiónico derivado de la destilación de la quitina, como agente reductor ya que se sabe que una molécula estable, biocompatible, barata y que además posee propiedades antitumorales (M. O. Kim et al., 2013; Kumar, Patel, Kumari, & Kumar, 2014). En este trabajo de tesis se sintetizaron AuNPs usando quitosano como agente reductor, y se analizó su efecto sobre células leucémicas k562 y Jurkat.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Hematopoyesis

La hematopoyesis es el proceso por el cual se forman las células sanguíneas, se deriva de dos vocablos griegos *hemo* que significa *sangre* y *poyesis* que quiere decir *creación*, es decir; *creación de la sangre*. Este proceso inicia a partir de la formación de una célula precursora común indiferenciada llamada célula madre hematopoyética multipotente (HSC; del inglés Hematopoietic Stem Cell) la cual comenzará la formación de células progenitoras comunes de monocitos (common myeloid progenitor, CMP) y progenitoras comunes de linfocitos (common lymphocyte progenitor, CLP) de las cuales se derivan células formadoras de colonia (UFC-GM o GMP) (Dzierzak & Philipsen, 2013). La línea mieloide o células de linaje mieloide son aquellas células que se forman en la médula ósea y que pasan a circulación por un proceso denominado mielopoyesis, el cual comprende la formación de células granulocíticas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos. Mientras que la línea linfoide se compone de aquellas células que se forman en la médula ósea pero que parte de su maduración o permanencia residen en órganos del sistema linfático. Este grupo incluye la formación de linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas y células asesinas naturales (NK), en un proceso llamado linfopoyesis (Onai et al., 2015). Ambos procesos incluyen una serie de eventos caracterizados por la pérdida progresiva de potenciales de diferenciación y la activación de programas transcripcionales específicos de un linaje, los cuales dependen de la liberación de ciertos factores de crecimiento como eritropoyetinas, trombopoyetinas y algunos mensajeros químicos como las interleucinas (**Figura 1**) (Dzierzak & Philipsen, 2013; E. Zhao et al., 2012).



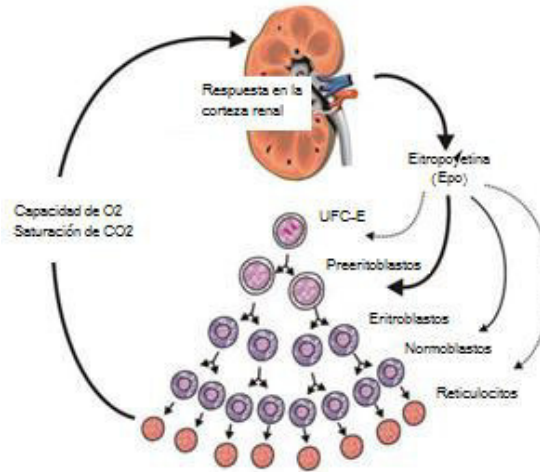
**Figura 1.Hematopoyesis.** Formación de las células sanguíneas a partir de una célula madre multipotente, la cual da paso a las células progenitoras comunes o unidades formadoras de colonia linfoides (UFC-L) granulocitos-monocitos (UFC-GM), eritrocitos-megacariocitos (UFC-EM) y posteriormente a las células diferenciadas (Modificado de Dzierzak & Philipsen, 2013).

### 3.1.1 Mielopoyesis

La mielopoyesis es la formación del linaje mieloide a partir de las unidades formadoras de colonia mieloide-linfoide (UFC-LM), la cual es precursora común de dos líneas mieloides, la unidad formadora de colonias eritromegacariocíticas (UFC-EM) y la unidad formadora de colonias granulomonocíticas (UFC-GM). La UFC-EM incluye la formación de la serie roja (eritropoyesis) y la formación de trombocitos (trombocitopoyesis). La UFC-GM comprende la formación de monocitos; monocitopoyesis y granulocitos; granulocitopoyesis (Dzierzak & Philipsen, 2013; Vietinghoff & Ley, 2012).

### 3.1.1.1 Eritropoyesis

La eritropoyesis es el proceso por el cual se generan las células rojas o eritrocitos. Es mediado por la respuesta a la disminución de  $O_2$  en circulación (hipoxia) a través de la función renal, la cual determina la producción de eritropoyetina (Epo), una hormona producida en la corteza renal principalmente, la cual estimula la proliferación y diferenciación de precursores de células rojas (Jelkmann, 2011). Este proceso consiste en una serie de eventos a partir de una célula madre pluripotente que se diferencia en células formadoras de colonias eritroides (UFC- E) las cuales dan origen a pre eritroblastos, normoblastos, reticulocitos y finalmente el eritrocito maduro (**Figura 2**) (Dzierzak & Philipsen, 2013).



**Figura 2. Eritropoyesis.** Producción y maduración de eritrocitos tras condiciones de hipoxia. Una vez que disminuyen los niveles de oxígeno en sangre (hipoxia), la corteza renal produce una mayor cantidad de eritropoyetina (Epo) la cual favorece la proliferación y diferenciación de las células inmaduras eritroides (Modificado de Jelkmann, 2011).

### 3.1.1.2 Granulocitopoyesis

La granulocitopoyesis abarca la formación de los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) los cuales son una categoría de las células blancas de la sangre que se caracterizan por la presencia de gránulos en el citoplasma. También se les llaman leucocitos polimorfos nucleares (PMN) a causa de las diferentes formas del núcleo. Los



granulocitos derivan de la UFC-GM y forman parte del sistema inmune innato, el cual es la primera barrera de defensa de los organismos. A partir de la UFC-GM se forman varias colonias, aquellas que formará a los neutrófilos (UFC-G) eosinófilos (UFC-Eo) y basófilos (UFC-Ba) (Smith, 1990; Vietinghoff & Ley, 2012; E. Zhao et al., 2012).

### **3.1.1.3 Monocitopoyesis**

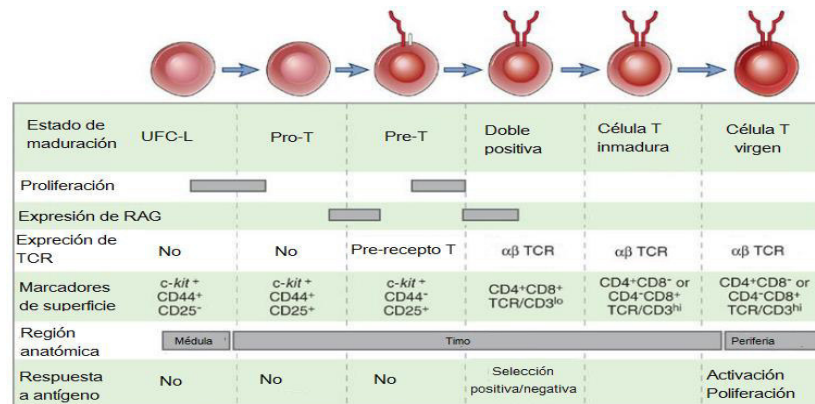
Los monocitos son los leucocitos de mayor tamaño, constituyen alrededor del 10% de las células que se encuentran en circulación periférica (Nichols, Bainton, & Farquhar, 1971). Se originan a partir de la UFC-M, dando lugar a un monoblasto que se transforma en promonocito y este a su vez en un monocito, el cual forma parte de la respuesta inmune innata. Los monocitos no poseen una reserva medular (Swirski et al., 2009) y migran a los tejidos donde pueden diferenciarse en macrófagos o células dendríticas (Dauer et al., 2003). Una vez en el tejido, el nombre y clasificación de la célula varía (Takahashi, 1994).

### **3.1.2 Linfopoyesis**

La linfopoyesis es el proceso por el cual se forman y maduran las células linfoides (linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y asesinas naturales) (Dzierzak & Philipsen, 2013). El proceso de maduración de los linfocitos requiere de una serie estímulos llevados a cabo dentro de la médula ósea y el timo a partir de la formación de una unidad formadora de colonia linfoide (UFC-L) la cual da origen a células inmaduras linfoides como pro-linfocito, pre-linfocito, linfoblasto que finalmente conlleva a la formación de un linfocito (Onai et al., 2015). En el caso de los linfocitos T, estos tienen su origen en la médula ósea pero llevan a cabo la mayor parte de su maduración en el timo, órgano por el cual reciben su nombre. Mientras que los linfocitos B permanecen en la médula ósea, antes de pasar directo a circulación. (E. Zhao et al., 2012). Los linfocitos T son los encargados de llevar a cabo la respuesta celular y los Linfocitos B de la respuesta humoral o mediada por anticuerpos (Levinson, 2008).

### 3.1.2.1 Linfocitos T

Las células progenitoras de los linfocitos T migran desde la médula ósea hacia el timo, lugar donde se lleva a cabo la mayor parte del proceso de maduración. Este proceso consiste en la generación de células T que expresan el receptor de linfocitos T (TCR) en la superficie de la membrana celular, el cual le confiere la capacidad de identificar lo propio y lo ajeno a través del reconocimiento de moléculas asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad de células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas. La serie Linfoide T comienza con un Linfocito Pro –T que da origen a un Pre –T, que a su vez origina a un linfoblasto y finalmente este a un linfocito virgen. El linfocito T virgen, dependiendo de los mensajeros químicos expuestos, se especializará en linfocitos T cooperadores (CD4+) o T helper (TH) que reconocerán moléculas MCH II o citotóxicos (CD8+) que reconocerán moléculas MHC I (**Figura 3**) (Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, 2014). Los CD4 vírgenes se pueden a su vez clasificar en subpoblaciones basadas en función del perfil de citocinas que son secretadas, teniendo así los efectores; TH1 (citocinas pro-inflamatorias) TH2, y TH17 (citocinas antiinflamatorias) y reguladores; Treg 1 y TH3 las cuales secretan TFG  $\beta$  principalmente (Okada, Kondo, Matsuki, Takata, & Takiguchi, 2008). .



**Figura 3. Etapas de maduración de linfocitos T.** Una vez fuera de la médula el linfocito migra hasta el Timo donde termina su proceso de maduración y expresión de TCR pasando (Modificado de Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, 2014)

### **3.2 Leucemia**

Las leucemias son los tipos de cáncer que se presentan en células derivadas de la médula ósea. La palabra leucemia proviene del griego *leuco* que significa *blanca* y *hemo*, *que significa, sangre*, “sangre blanca o Weisses Blut” término que fue propuesto por Rudolf Virchow en 1846 (Ortiz-hidalgo, 2013). Esta enfermedad consiste en la ausencia de regulación sobre crecimiento, proliferación, así como la falta de función de los leucocitos o glóbulos blancos (Hanahan & Weinberg, 2011), células que bajo condiciones de homeostasis componen la primera barrera del sistema inmunológico (E. Zhao et al., 2012). De acuerdo a sus características clínicas y celulares esta puede ser clasificada en base a la población celular ( linaje mieloide y linfoide) y la agresividad (de curso agudo y las de curso crónico) (Tefferi & Vardiman, 2008). Las leucemias de curso agudo son las más severas, ya que afectan principalmente a las células en proceso de maduración (American Cancer Society, 2016b). Las leucemias a su vez pueden ser clasificada en subtipos de acuerdo a sus características celulares específicas como mutaciones o translocaciones (Arber et al., 2016). Como lo describimos anteriormente las líneas celulares con las que se trabajará pertenecen a una tipo de leucemia mieloide crónica eritroide (k562) y leucemia linfoide aguda de células precursoras de células T (Jurkat), por lo que en seguida se describirán la fisiopatología de ambos tipos de leucemia.

#### **3.2.1 Leucemia linfoide aguda**

La leucemia linfoide aguda o ALL (Acute Lymphoid Leukemia) es un trastorno maligno que se origina en la médula ósea y que se caracteriza por una proliferación desordenada y por el aumento en la producción de células inmaduras, blastos, a nivel periférico. Se diagnostica como ALL positivo cuando el 25 % de la médula es remplazada por linfocitos malignos (American Cancer Society, 2016). En México no existe un dato epidemiológico preciso sobre el comportamiento de la leucemia linfoide aguda, aunque algunos autores indican que el número de casos nuevos por año corresponde al 10% del total de leucemias (Terreros et al., 2009). Además, se ha reportado que las neoplasias de origen hematopoyético representan la primera causa de muerte en menores de 20 años

(INEGI, 2013), siendo la leucemia la principal y de las cuales la leucemia linfocítica aguda representa al 76% (Ortega Sánchez, María Luisa Osnaya Ortega, 2008). Algunos autores señalan que este tipo de neoplasia es el cáncer infantil más frecuente y su máxima incidencia se produce entre los 2 y 5 años y en el sexo masculino (relación 2:1), el cual presenta dos picos epidemiológicos, uno a los 4 años y otro alrededor de los 50 (Ortega Sánchez, María Luisa Osnaya Ortega, 2008). Este tipo de leucemia se divide en dos, aquella que afecta los estadios tempranos de las células B y la que afecta las células T, la patogénesis de esta última es diversa y se caracteriza en su mayoría por alteraciones genómicas principalmente en factores de transcripción de vías de diferenciación (Mullighan, 2012).

### **3.2.1.1 Patogénesis ALL de células T**

La leucemia linfocítica aguda de células T representa alrededor del 25 % de las leucemias agudas (Chiaretti & Foà, 2009). La patogénesis de este subtipo de leucemia es muy amplia ya que abarca una serie alteraciones cromosómicas diversas tales como hiperdiploidias, hipodiploidias, translocaciones y reordenamientos estructurales que permiten mutaciones en genes que están involucrados con el desarrollo temprano de las células linfocíticas (De Kouchkovsky & Abdul-Hay, 2016; Zuckerman & Rowe, 2014), tales como Notch1, receptor transmembrana que de forma fisiológica juega un papel importante en la maduración de células linfocíticas (Pui et al., 1999; Weng et al., 2006) y que se encuentra mutado alrededor de 50% de los casos de ALL-T (Erika Haydu J, 2010; Ferrando, 2011; Hales, Taub, & Matherly, 2014; M. Liu et al., 2013; Zuckerman & Rowe, 2014). Así como también reordenamientos en factores de transcripción como TLX1 (HOX11), TLX3 (HOX11L2), LYL1, TAL1 y MLL (Mullighan, 2012), y pérdida de la función de reguladores hematopoyéticos (GATA3, IKZF1, RUNX1, ETV6) (Zuckerman & Rowe, 2014), reguladores epigenéticos como (EZH2, SUZ12, EED, SETD2, DNMT3A) (Erika Haydu J, 2010; Zuckerman & Rowe, 2014), y mutaciones que permiten a la célula leucémica evadir la muerte celular por apoptosis a través de la inhibición de la expresión de p53 (Demarest, Ratti, & Capobianco, 2008), vías de proliferación celular como JAK1 en un 18% de los casos de ALL de células T en

adultos, y el 2% de las pediátricas (Flex et al., 2008), mutaciones en el receptor de interleucina 7 (IL-7R) (Zenatti et al., 2011) y la presencia en un porcentaje muy bajo de cromosoma Filadelfia y el gen BCR-ABL (Kannan, 2015).

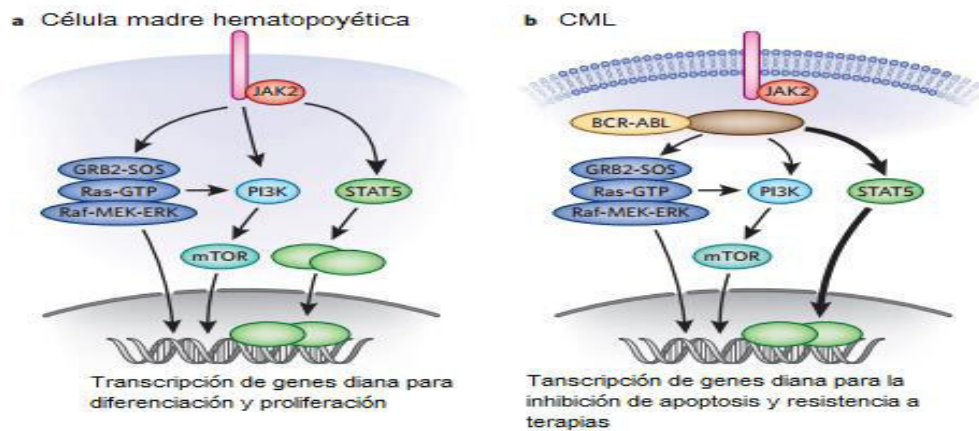
### **3.2.2 Leucemia mieloide crónica**

La leucemia mieloide crónica o CML (Chronic Myeloid Leukemia) es un desorden mieloproliferativo que representa alrededor del 15 % de los tipos de leucemia (Jabbour & Kanterjian, 2014). Se caracteriza principalmente en un aumento predominante y desregulado de estadios diferenciados del linaje mieloide, afectando principalmente a la serie eritroide y granulocítica (Baccarani et al., 2012; Nagamos, Gentile, & Vajpayee, 2016). Estadísticamente representa el tipo de leucemia más diagnosticado durante la edad adulta y su frecuencia en niños es relativamente baja (Shanafelt, 2013). Clínicamente se clasifica en dos: la fase inicial o fase crónica, en la que el exceso de producción de granulocitos es fácilmente controlable y donde el paciente tiene un mejor pronóstico, esta fase se puede mantener por largos periodos de tiempo. Por otro lado está la fase aguda o fase blástica la cual representa una mayor acentuación de los signos clínicos, una mayor resistencia al tratamiento y la cual es de peor prognosis (American Cancer Society, 2016; Fabbro, 2012)

#### **3.2.2.1 Patogénesis CML**

La patogénesis de la leucemia mieloide crónica consiste principalmente en una anormalidad cromosomal asociada a la translocación recíproca entre un fragmento del cromosoma 22, que contiene el segmento del gen BCR (Breakpoint Cluster Region) y el segmento del proto-oncogén ABL del cromosoma 9 (t9:22) conocida como cromosoma filadelfia (Deininger et al., 2000; Maru, 2012). El producto de esta alteración cromosomal es la formación de un gen quimérico llamado BCR-ABL el cual codifica para un mRNA BCR-ABL y una proteína disfuncional BCR-ABL que actúa como tirosina quinasa, una enzima que activa otras proteínas mediante la fosforilación de residuos tirosina (Fabbro, 2012). La fusión de este gen involucra principalmente la

región del exón 2 del gen ABL, mientras que puede incluir diferentes exones del gen BCR, siendo los más comunes b2a2 o b3a2, que codifican para BCR-ABL p210, e1a2 que codifican para p190 y otros en c3a2 codifican para p230, siendo el p210 el más común en México (Arana-Trejo et al., 2002). En una célula madre hematopoyética sana, la señalización celular esta mediada por estímulos receptor-ligando como la IL-3 y el factor de estimulante de colonias granulocito monocito (GM-CSF) las cuales activan una cascada de señalización que conducen a la expresión de factores de transcripción de diferenciación y proliferación de manera regulada, mientras que en una célula de CML, la presencia del gen BCR-ABL induce la activación de vías de señalización celular independiente del estímulo externo, lo cual favorece el crecimiento constante y desregulado. Este gen involucra la activación de diversas vías de proliferación como Myc, RAS, ERK, PI3, JNK (Xie, Lin, Sun, & Arlinghaus, 2002), sin embargo en la mayoría de los casos existe una activación constitutiva de la vía de señalización JAK2-STAT5 lo que conduce a la transcripción de genes asociados a la resistencia a la muerte celular por apoptosis y un crecimiento celular desregulado (**Figura 4**) (Fabbro, 2012; Mullighan, 2012).



**Figura 4. Aspectos moleculares de la patogénesis de leucemia mieloide crónica.** (a)

En una célula madre hematopoyética la activación de factores de transcripción asociados a proliferación y diferenciación celular están asociados a la presencia de un ligando y la dependencia de JAK2 y STAT5. (b) En las células de CML la presencia del gen BCR-ABL mantiene activación constitutiva de factores de transcripción de resistencia a muerte y proliferación que no son dependientes de estímulos externos. (Modificado de Fabbro, 2012).

### 3.3 Tratamientos anti-leucémicos

#### 3.3.1 Tratamientos ALL

El tratamiento de la ALL-T consiste principalmente en el uso combinado de diversos tipos de fármacos antineoplásicos y procedimientos y técnicas quirúrgicas como la leucoféresis y el trasplante de células hematopoyéticas. El protocolo terapéutico dependerá de factores importantes como lo son el estado general del paciente, la edad, la condición corporal, factores genéticos, progresión de los signos clínicos, así como el determinar los grupos de riesgo. El tratamiento en general consta de 3 fases: inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento los cuales son resumidos en la **Tabla 1**. Las principales fármacos empleados en el tratamiento de las ALL se encuentran resumidas en la **Tabla 2** (Leukemia & Lymphoma Society, 2014).

**Tabla 1. Esquema de tratamiento en pacientes con ALL.**

<i>Fase del tratamiento</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Características</i>	<i>Objetivo</i>
<i>Inducción</i>	4-6 semanas	Quimioterapia múltiple, profilaxis del SNC.	Remisión
<i>Consolidación</i>	4-6 meses	Ciclos cortos de terapia combinada	Asintomático
<i>Mantenimiento</i>	2-3 años	1-2 tratamientos intensificados	Evitar reincidencia

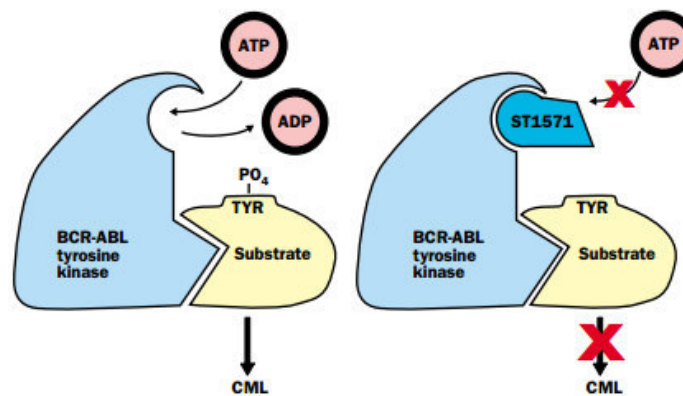
**Tabla 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda.**

<b>Tipo</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<b>Quimioterapia</b>	Vincristina	Enlaza proteínas tubulares durante la fase de metafase de la mitosis. Inhibe la polimerización de la tubulina a microtúbulos.
	Etoposido	Inhibe la síntesis DNA e induce arresto en la fase G <sub>2</sub> del ciclo celular.
	Ciclofosfamida	Impide la síntesis del DNA e induce muerte celular.
	Doxorrubicina	Se intercala con el DNA e inhibe la síntesis de ácidos nucleicos.
	Metotrexato	Inhibe competitivamente la dihidrofolato-reductasa, enzima responsable de convertir el ácido fólico a tetrahidrofolato, el cofactor necesario para la transferencia de un carbono en muchas reacciones metabólicas.
<b>Corticosteroides</b>	Prednisona	Esteroides sintéticos que actúan inhibiendo la respuesta inmunológica mediante la expresión y represión de factores de transcripción pro y anti-inflamatorios.
	Prednisolona	
	Dexametasona	
<b>Anticuerpos monoclonales</b>	Alemtuzumab	Inhibidores del receptor tirosina-kinasa. Inhiben los procesos celulares mediados por ambos factores de crecimiento.
	Rituximab	
	Imatinib	



### 3.3.2 Tratamiento CML

El tratamiento de la CML consta principalmente del uso de inhibidores de tirosina quinasa (TKI) y procedimientos quirúrgicos como el trasplante de células madre hematopoyéticas. El esquema terapéutico depende de la fase clínica en la que se encuentre el paciente y su condición corporal, siendo los fármacos TKI el tratamiento de primera elección en la mayoría de los casos como es el caso del Imatinib. Este actúa inhibiendo los sitios activos para el ATP de la enzima tirosina quinasa BCR-ABL, evitando la fosforilación de proteínas involucradas en las principales vías de proliferación y crecimiento celular (**Figura 5**) (O'Dwyer & Druker, 2000; Paul & Mukhopadhyay, 2004). A partir del Imatinib se han desarrollado y aprobado para uso clínico numerosos TKI como: gefitinib, erlotinib, sunitinib, lapatinib, nilotinib y dasatinib (Lankheet et al., 2013), los cuales reducen la proliferación, inducen arresto en el ciclo celular, disminuyen la angiogénesis, e inducen muerte celular por apoptosis (Airiau et al., 2012; Paul & Mukhopadhyay, 2004). Sin embargo, se ha observado que este tipo de fármacos son capaces de inhibir el gen BCR-ABL pero no de inducir la muerte en células progenitoras de CML (Corbin A., 2011; Hamilton et al., 2015).



**Figura 5. Mecanismo de acción de Inhibidores de tirosina quinasa.** Los ITK evitan la unión de ATP a los sitios activos de las BCR-ABL tirosina quinazas, evitando la posterior señalización en las células de CML (Tomado de O'Dwyer & Druker, 2000).

### 3.3.3 Mecanismos de resistencia a las terapias antitumorales

Los mecanismos de resistencia a las terapias antitumorales son diversos e involucran una gran cantidad de factores que le confieren a la célula cancerosa una mayor permanencia y supervivencia a los principales esquemas terapéuticos, como lo son la quimioterapia, radioterapia y terapias dirigidas (Hasanali, 2015; Labi & Erlacher, 2015; Willers, Azzoli, Santivasi, & Xia, 2013). Esta resistencia está asociada a cambios epigenéticos (Hasanali, 2015), modificaciones en el microambiente tumoral (Quail et al., 2016), y principalmente características propias de las células cancerosas (Hanahan & Weinberg, 2011; Hasanali, 2015; Knoechel & Aster, 2015; Schmidt et al., 2004). La célula tumoral o cancerosa posee una serie de características que las particularizan de las células sanas. Estos marcadores incluyen un estado proliferativo, evasión a los supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis, activación de invasión y metástasis, un estado permanente de replicación por fallas en la regulación del ciclo celular así como una evasión a la inducción de la muerte celular regulada (**Figura 6**) (Hanahan & Weinberg, 2011). Siendo esta última una de las características más importantes en la resistencia a las terapias anti- leucémicas (Darding & Meier, 2012; Martinez-Torres et al., 2015; Schmidt et al., 2004).



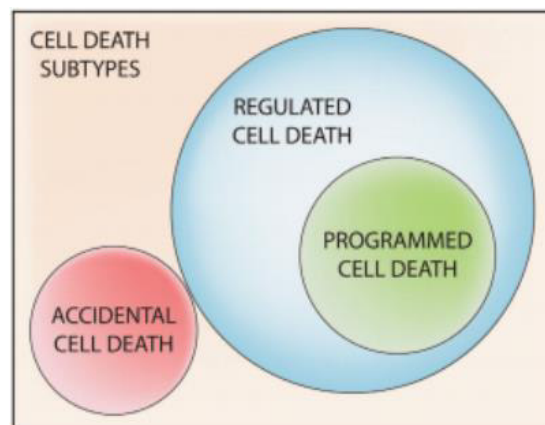
**Figura 6. Principales características de las células cancerosas.** Estas incluyen factores como un estado proliferativo constante, evasión a supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte celular regulada (Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

### 3.4 Muerte celular

Como anteriormente se mencionó, una de las características de las células cancerosas que se ve altamente implicado en la resistencia a los tratamientos convencionales antitumorales es la desregulación en el proceso de muerte celular regulada (MCR), que lleva a una evasión de la misma por parte de la célula tumoral y que produce un estado de inmortalidad. Por ende, la inducción de muerte en estas células es uno de los principales enfoques de los tratamientos contra el cáncer (Hassan, Watari, Abualmaaty, Ohba, & Sakuragi, 2014; Lowe & Lin, 2000). La muerte celular es un proceso natural que forma parte de la biología de la célula, el cual consiste en el cese de funciones de la misma de forma permanente e irreversible. El comité de nomenclatura en muerte celular o NCCD (*Nomenclature Committee on Cell death*) describe la muerte celular como un proceso que ocurre después de un daño que la célula es incapaz de reparar, por lo que la célula atraviesa el punto de no retorno y exhibe una serie de características como lo es una irreversible permeabilización de la membrana y completa fragmentación nuclear (Kroemer, Galluzzi, Vandenabeele, Abrams, Alnemri, Baehrecke, Blagosklonny, El-Deiry, Golstein, Green, Hengartner, Knight, Kumar, Lipton, Malorni, Nunez, et al., 2009). Sin embargo, el criterio para clasificar y definir la muerte celular es muy amplio ya que desde que nació el concepto de la teoría celular en 1838 se han descrito muchos parámetros para lograr una correcta definición y características de la muerte celular (Tavassoli, 1980), siendo finalmente clasificada por la NCCD en dos grupos; muerte accidental y regulada.

La **muerte celular accidental** (MCA o ACD por sus siglas en inglés: Accidental Cell Death) ocurre cuando la célula sufre severos daños en su estructura provocados por diversos agentes ya sea físicos, químicos o mecánicos (Darzynkiewicz et al., 1997). Este tipo de muerte celular fue el primer término descrito y fue considerado como el único evento de muerte celular, el cual estaba asociado a procesos infecciosos y patológicos, llamado indistintamente *Necrosis* (Halestrap, Doran, Gillespie, & O'Toole, 2000). La NCCD sugiere que el término *Necrosis*, como término para definir la muerte accidental, sea remplazado por *Oncosis*, debido al hinchamiento que presenta la célula y la cual es una de sus principales características morfológicas (Kroemer, Galluzzi, Vandenabeele, Abrams, Alnemri, Baehrecke, Blagosklonny, El-Deiry, Golstein, Green, Hengartner,

Knight, Kumar, Lipton, Malorni, Nuñez, et al., 2009). La Oncosis se caracteriza por no tener una maquinaria específica que controle la secuencia de eventos que conllevan a la muerte, la cual concluye en una liberación abrupta y desorganizada de sus componentes intracelulares como DNA, ATP y otros DAMPS (Patrones moleculares asociados a daño), estructuras altamente inmunogénicas (Gamrekelashvili, Greten, & Korangy, 2015). Por otro lado, la **muerte celular regulada** (MCR o RCD por sus siglas en inglés *Regulated Cell Death*) es un tipo de muerte que posee una maquinaria molecular específica que controla de manera sistemática cada evento ocurrido dentro de la célula (Ashkenazi & Salvesen, 2014a; Testa & Riccioni, 2007). Este mecanismo está involucrado principalmente en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos, desarrollo del sistema inmunológico y desarrollo temprano de los organismos, lugar donde se observó por primera vez un mecanismo programado (Diamantis, Magiorkinis, Sakorafas, & Androutsos, 2008; Elmore, 2010), motivo por el que se le conoció por mucho tiempo como **muerte celular programada** o MCP (Programmed Cell Death, PCD). Hasta hace unos años el término MCP era utilizado como sinónimo de MCR, sin embargo hoy en día este es cada vez menos utilizado y menos recomendado, ya que la MCP es un subtipo de MCR (**Figura 7**) (Galluzzi et al., 2014).



**Figura 7. Clasificación de la muerte celular.** La muerte celular se clasifica en dos subtipos, muerte celular accidental, MCA (Accidental cell death, ACD) y muerte celular regulada, MCR (Regulated cell death, RCD). Dentro de la MCR encontramos la muerte celular programada, MCP (Programmed cell death, PCD) (Tomado de Galluzzi et al., 2014).

### 3.4.1 Clasificación de la muerte celular regulada.

Como se mencionó anteriormente, a partir del descubrimiento de la teoría celular (Tavassoli, 1980), *Necrosis* fue el único tipo de muerte celular conocido, éste se caracterizaba por una serie de eventos morfológicos desregulados como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, deformación de organelos, pérdida de la estructura nuclear y pérdida de la estructura celular por hinchamiento (Oncosis) (Majno & Joris, 1995). En el año 1842 Karl Christoph Vogt observó que los organismos en su desarrollo sufrían un proceso de selección y muerte celular. Sin embargo, la importancia de estos descubrimientos no se retomó hasta 1951 por Glucksmann y 1961 por Kerr quien fuera el primero en publicar un artículo sobre muerte celular basado en sus investigaciones sobre la isquemia (**Figura 8**) (Kerr, 1965). Sin embargo no fue hasta 1964 cuando Lockshin describió lo que ahora conocemos como muerte celular programada (MCP) al observar el comportamiento celular en el desarrollo de embriones, esto fue el parteaguas que llevó a la formación de un concepto dicotómico de la muerte celular que se consolidó en el año de 1972, cuando los patólogos J.F Kerr, A.H Wyllie y A.R Currie acuñaron el término *Apoptosis* a las células que mueren de forma fisiológica. Este término proviene del griego y significa: Acto de caer, como caen los pétalos de las flores y las hojas de los árboles en el otoño “*Falling leaves*” (Bennetts & Pierce, 2010), y fue elegido porque sugiere pérdidas benéficas como lo son el modelamiento de las estructuras durante la embriogénesis (D.L, 2002).

A HISTOCHEMICAL STUDY OF HYPERTROPHY AND  
ISCHAEMIC INJURY OF RAT LIVER WITH SPECIAL  
REFERENCE TO CHANGES IN LYSOSOMES

J. F. R. KERR\*

Department of Morbid Anatomy, University College Hospital  
Medical School, London

PLATES CXII-CXVII

THE lytic nature of lysosomal enzymes and their release by various experimental procedures (Appelmans, Wattiaux and de Duve, 1955; de Duve *et al.*, 1955) have suggested that they might be responsible for cell necrosis in damaged tissues (de Duve and Beaufay, 1959; Van Lancker and Holtzer, 1959).

That segregated cytoplasmic constituents can be degraded inside lysosomes (Ashford and Porter, 1962; Novikoff and Essner, 1962a and b; Hruban *et al.*, 1963) indicates that they are probably concerned with the recovery of sublethally injured cells. Because of the diversity of cell types found in many pathological processes, the results of chemical analysis of lysosome changes have been difficult to interpret (de Duve, 1963, 1964). Histochemical techniques should be useful in the study of such heterogeneous populations.

The Gomori method for acid phosphatase accurately delineates lysosomes in normal liver (Holt and Hicks, 1961; Goldfischer, Essner and Novikoff, 1964). If it were found that two different methods for acid phosphatase gave the same results in abnormal cells, confidence in their validity would be increased. There is histochemical evidence that lysosomes contain an esterase (Novikoff, 1961, 1963; Shnitka and Seligman, 1961; Holt and Hicks, 1962), but this is in conflict with biochemical data (Holt, 1963). A comparison of staining patterns for acid phosphatase and esterases in pathological conditions might throw light on the problem.

This paper describes a histochemical study of the diverse cell changes found in the livers of rats after ligation of the portal vein branches to the left and median lobes (Steiner and Martinez, 1961). Special attention is paid to the demonstration of non-specific acid phosphatase and esterases.

MATERIALS AND METHODS

Male Wistar albino rats whose weights ranged from 304 to 490 g. were used. MRC diet 41B and water were continuously available both before and after operation. The temperature of the animal house was maintained at about 20° C. Rats were anaesthetised with ether, and with strict aseptic technique the portal vein branches to the left and median liver lobes were doubly ligated with 3/0 braided silk; care was taken not to damage branches of the hepatic artery or bile duct.

\* Present address: Department of Pathology, University of Queensland Medical School, Brisbane, Australia.

**Figura 8. Primer artículo publicado sobre muerte celular regulada.** Portada y resumen del primer artículo publicado en la historia sobre muerte celular (Editado de Kerr, 1965).

A diferencia de la muerte por necrosis, la apoptosis poseía características morfológicas que diferían del proceso no regulado tal como la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, formación de vesículas (cuerpos apoptóticos), una mínima modificación en la estructura de los organelos, así como el adelgazamiento de la célula (Diamantis *et al.*, 2008; Majno & Joris, 1995). Posteriormente se incluyó la **Autofagia** como el tercer tipo de muerte celular (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Características morfológicas de los tres principales tipos de muerte celular.**

<i>Tipo de muerte celular</i>	<i>Características</i>
<i>Necrosis (Oncosis)</i>	Perdida estructural de la membrana nuclear y celular, aumento de tamaño por hinchamiento.
<i>Apoptosis</i>	Condensación de cromatina, formación de vesículas (cuerpos apoptóticos), fragmentación nuclear, adelgazamiento de la célula.
<i>Autofagia</i>	Formación de vacuolas intracitoplasmáticas, no posee características ni de necrosis, ni apoptosis.

El desarrollo de la tecnología permitió clasificar los distintos tipos de muerte celular a base de sus características bioquímicas y moleculares. Se encontró que el proceso de muerte celular regulada estaba dividido en dos subtipos, el primero fue llamado **muerte celular regulada dependiente de caspasas** ya que involucraba el reclutamiento y activación de enzimas llamadas caspasas (cisteín asparato-proteasas). En el segundo se observó que estas enzimas no formaban parte indispensable de los procesos de muerte celular por lo que se llamó **muerte celular regulada independiente de caspasas** (Kroemer, Galluzzi, Vandenabeele, Abrams, Alnemri, Baehrecke, Blagosklonny, El-Deiry, Golstein, Green, Hengartner, Knight, Kumar, Lipton, Malorni, Nuñez, et al., 2009).

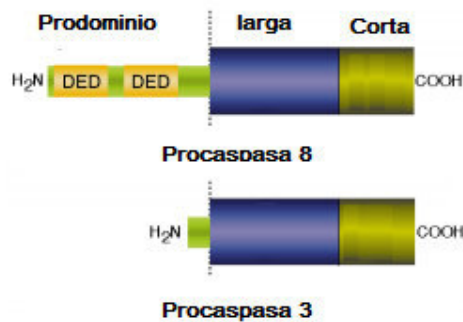
### 3.5 Muerte celular dependiente de caspasas

Las caspasas son un grupo de endoproteasas de tipo **cisteinil-aspartato-proteasas (caspasas)** que hidrolizan uniones peptídicas dependientes de residuos catalíticos de cisteína para producir la ruptura de otras proteínas (Pop & Salvesen, 2009). La familia de caspasas está compuesta por 14 proteínas de las cuales 11 corresponden a proteínas

humanas. La clasificación de las caspasas se basa principalmente en el tipo de función: las caspasas inflamatorias y caspasas de muerte (apoptosis). Estas últimas a su vez en dos grupos: activadoras y efectoras (**Tabla 4**).

**Tabla 4. Clasificación de caspasas involucradas en la muerte celular.**

<i>Tipo</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Caspasa</i>
<i>Inflamatoria</i>		1, 4, 5, 12
<i>Muerte celular</i>	Activadora	8, 9, 2, 10
	Efectora	3, 6, 9



**Figura 9. Estructura de procaspasas.** Las procaspasas son estructuras monoméricas formadas por una subunidad corta, una subunidad larga y en el caso de las caspasas activadoras un prodominio (Modificado de (Earnshaw, Martins, & Kaufmann, 1999)).

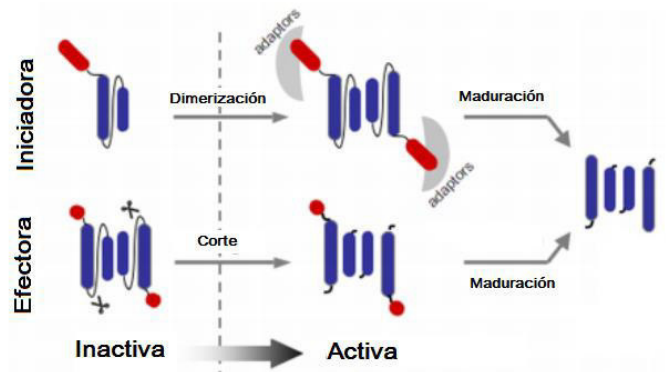
Ambos tipos de caspasas se encuentran inicialmente como estructuras monoméricas inactivas llamadas procaspasas, formadas por una subunidad corta, una subunidad larga (**Figura 9**). En el caso de las caspasas activadoras e inflamatorias, estas poseen un prodominio el cual determina el tipo de unión proteína-proteína. La caspasa 1, 2, 4, 5, 12 y 9 poseen un dominio CARD (Caspase activation and recruitment domain), mientras que la 8 y 10 poseen un dominio DED (death effector domain) (**Tabla 5**) (H. Wu & Lo, 2009).



**Tabla 5. Tipos de dominio interacción proteína-proteína.**

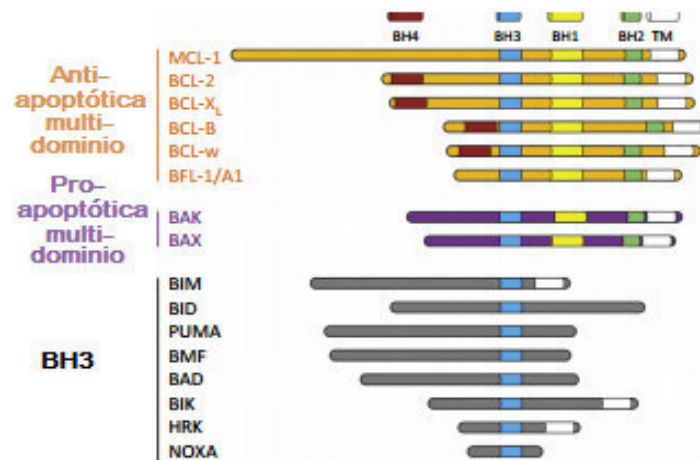
<i>Caspasa</i>	<i>Dominio</i>
1, 2, 4, 5, 12 y 9	CARD
8, 10	DED

Para que las caspasas sean activas requieren de diferentes procesos. Las caspasas activadoras se encuentran en un estado inactivo en forma de monómeros (prodominio-subunidad grande- subunidad pequeña), y para poder ser activadas requieren de la unión de dos monómeros los cuales pasan por un proceso de corte por auto catálisis para formar una estructura única (dimerización). Este proceso es facilitado por moléculas adaptadoras con afinidad a los dominios DED y CARD, los cuales posteriormente son cortados para formar una caspasa activadora madura en forma de heterotetrámero (**Figura 10**). Las caspasas efectoras por otra parte son homodímeros que requieren la acción de las caspasas activadoras para realizar un corte proteolítico entre las dos subunidades y generar un reacomodo estructural que resulta en la formación de un heterotetrámero (Lavrik et al., 2003).



**Figura 10. Procesos de activación de caspasas.** Las caspasas iniciadoras son monómeros que requieren de un proceso de dimerización para ser activadas. Las caspasas efectoras son homodímeros que requieren un corte proteolítico y un reacomodo estructural equivalente al de las caspasas iniciadoras para estar activadas (las tijeras representan los sitios de corte) (Modificado de Pop & Salvesen, 2009).

Otro grupo de proteínas involucrado en los procesos de muerte celular es la familia de proteínas Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) la cual está formada por alrededor de 25 miembros que regulan procesos de muerte celular (Petros, Olejniczak, & Fesik, 2004). Estas proteínas pueden clasificarse de diferentes maneras. Su clasificación funcional las divide en i) las que evitan la muerte celular (anti-apoptóticas) como Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-w, Bfl-1; y ii) aquellas que favorecen la activación de la muerte celular (pro-apoptóticas) como Bax, Bak, Bad (**Tabla 6**). De acuerdo a su estructura se dividen también en dos: i) las que poseen diferentes tipos de regiones BH (Bcl-2 homology) o regiones multi-dominio; y ii) las que sólo poseen un tipo de dominio BH 3 (**Figura 11**) (Giménez-Cassina & Danial, 2015; Rech de Laval, Deleage, Aouacheria, & Combet, 2014).



**Figura 11. Estructura y clasificación de la familia Bcl-2.** Las proteínas Bcl-2 se dividen en aquellas que no permiten la muerte celular (anti-apoptóticas) y aquellas que favorecen la muerte celular (pro-apoptóticas). A su vez éstas se clasifican en las que poseen multi-dominios BH y las que sólo poseen dominio BH3 (Modificado de Giménez-Cassina & Danial, 2015).

**Tabla 6. Clasificación de la familia de proteínas Bcl-2.**

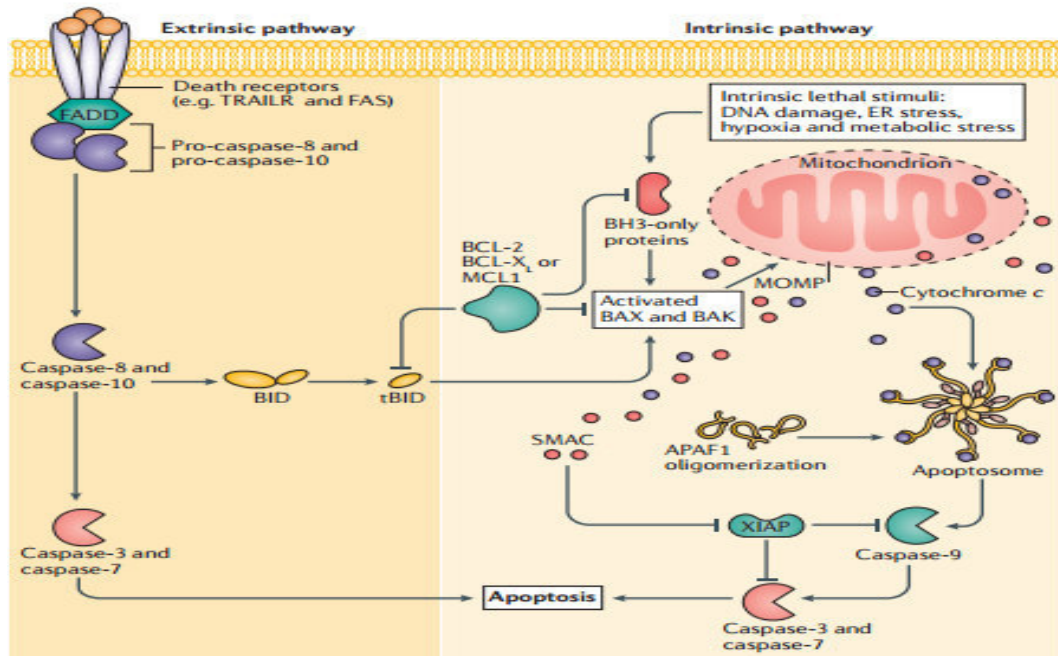
<i>Tipo</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Proteína</i>
<i>Anti-apoptótica</i>	Multi-dominio	Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-w, Bfl-1
<i>Pro-apoptótica</i>	Multi-dominio	Bak, Bax
	BH 3	Bim, Bid, PUMA, Bmf, Bad, Bik, Hrk, NOXA

#### **3.4.1.1.1 Apoptosis**

La apoptosis fue el primer tipo de muerte celular regulada descrito y por mucho tiempo fue considerado el único tipo de MCR. Se descubrió al estudiar los procesos del desarrollo embrionario, por lo que se le consideró sinónimo de muerte celular programada (MCP) (Diamantis et al., 2008). Sin embargo sabemos que ahora forma parte de muchos procesos fisiológicos como lo son la maduración de las células linfoides, mantenimiento de la homeostasis (Ekert & Vaux, 1997), además de que se observado que proteínas involucradas en esta vía de muerte celular como caspasas y proteínas Bcl-2, han determinado que esta tiene un papel importante en desarrollo y regulación de la carcinogénesis (Lowe & Lin, 2000). Por lo que la inducción de la apoptosis es un considerada un potencial blanco en la terapia antitumoral (Darding & Meier, 2012). Esta se clasifica en apoptosis extrínseca e intrínseca.

#### 3.4.1.1.2 Vía intrínseca

La vía intrínseca también llamada vía mitocondrial puede ser activada a partir de diferentes estímulos como lo son el daño al DNA, estrés oxidativo, estrés metabólico e hipoxia. Este proceso conlleva a la activación de proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas de dominio BH3 como NOXA y PUMA, que a su vez activan a Bax y Bak las cuales se encuentran en la membrana externa mitocondrial, generando permeabilización de la membrana mitocondrial externa (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) (Ashkenazi & Salvesen, 2014b), lo cual favorece la liberación de DIABLO, la proteína SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) más importante (Galluzzi et al., 2014), y citocromo C, las cuales se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria. Una vez que el citocromo C se encuentra en el espacio citoplasmático interactúa con Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) el cual se une a procaspasa-9, este complejo forma una estructura multi-molecular llamada apoptosoma (Acehan et al., 2002; Ichim & Tait, 2016). Por otro lado SMAC bloquea a los inhibidores de caspasa XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis Protein), lo que permite que finalmente se active la caspasa 9 lo cual a su vez activa a las caspasas efectoras 3 y 7 (**Figura 12**) (Elmore, 2010; Ichim & Tait, 2016). La activación de las caspasas efectoras conlleva a una serie de eventos como lo es la translocación y activación de CAD (caspase-activated DNase) o DFF en humanos (DNA Fragmentation Factor), lo cual induce la fragmentación nuclear, además de que se bloquea la función de PARP1 (Poly(ADP-ribosylation) como enzima reparadora de DNA (D'Amours, Sallmann, Dixit, & Poirier, 2001) y se induce la fosforilación de la histona H2AX que inicia la condensación de la cromatina (Rybaczek & Maszewski, 2007), se produce la disrupción de los filamentos de actina, se activa XRP8 (Xk-related protein 8) que induce la degradación y pérdida de la asimetría lipídica de la membrana lo que produce la translocación y exposición de la fosfatidilserina a la membrana celular externa (G. Koopman, C.P.M. Reutelingsperger, G.A.M. Kuijten, R.M.J. Keehnen, S.T. Pals, 1994; Mariño & Kroemer, 2013), y finalmente se induce la pérdida de la permeabilidad de la membrana plasmática y por ende la célula muere.



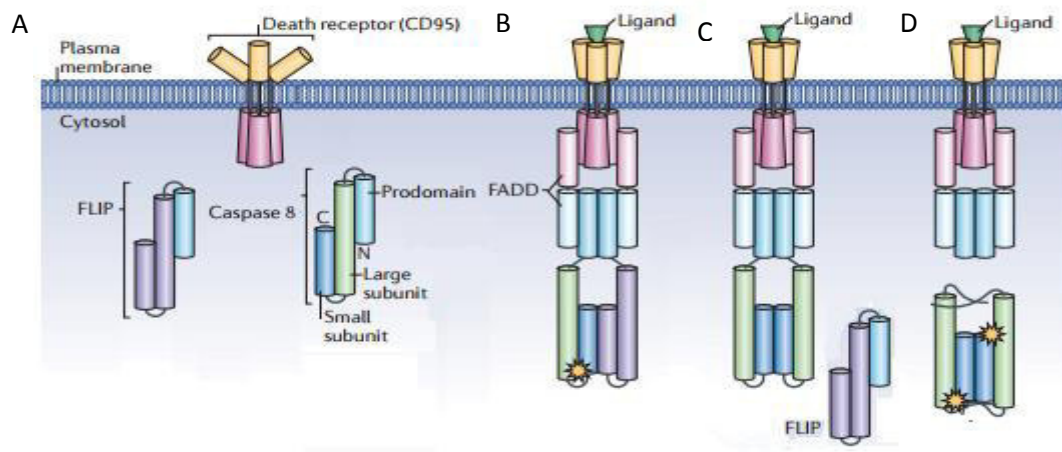
**Figura 12. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.** La vía intrínseca se activa a través de daño al DNA o factores internos como estrés. Esto conlleva a la activación de BAX y BAK induciendo la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) lo cual libera citocromo C y proteínas SMAC. El citocromo C, APAF-1 y procaspasas 9 se unen formando el apoptosoma. Por otra parte SMAC/Diablo bloquea XIAP, lo que permite que al apoptosoma activar caspasa 9 y a su vez caspasa 3 y 7. La vía extrínseca se activa a través de receptores de muerte (TRAIL o FAS) los cuales se unen a una proteína adaptadora (FADD) que al unirse a procaspasa 8 o 10 forma el complejo DISC el cual activa caspasa 8 o 10. Este puede activar caspasa 3 y 7 directamente o activar Bid y desencadenar la vía intrínseca (Tomada de Ichim & Tait, 2016).

### 3.4.1.1.3 Vía extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis involucra la participación de interacciones mediadas por receptores transmembranales conocidos como receptores de muerte y sus ligandos (**Tabla 7**) (Pérez, Alarcón-, Almanza-pérez, & López-díaz, 2010; Wajant & Scheurich, 2011). Una vez que el ligando se une al receptor de muerte ocurre la trimerización del receptor, lo que produce la asociación de a una proteína adaptadora llamada FADD (FAS-associated death domain Protein) por medio de dominios de muerte (DD). A su vez FADD posee dominios efectores de muerte o DED (domains effector death), cuya dimerización causa la interacción con procaspasa 8, la cual se encuentra unida con c-FLIP (cellular FLICE inhibitory Protein) una proteína con una estructura muy similar a la procaspasa que no cuenta con una región catalítica (**Figura 13**) (Oberst & Green, 2011). FADD se une a procaspasa 8 y permite que ocurra el proceso de auto catálisis, lo cual activa caspasa 8 y forma el complejo de señalización de la muerte inducida o DISC (death inducing signaling complex) (J. W. Kim, Choi, & Joe, 2000). Una vez activa, la caspasa 8 puede directamente activar a las caspasas 3 y 7 o cortar y activar a Bid, una proteína pro-apoptótica BH3, que conduce a la activación de BAX y BAD y consecuentemente la activación de la vía intrínseca de apoptosis (**Figura 11**) (Ichim & Tait, 2016).

**Tabla 7. Receptores de muerte y ligandos.**

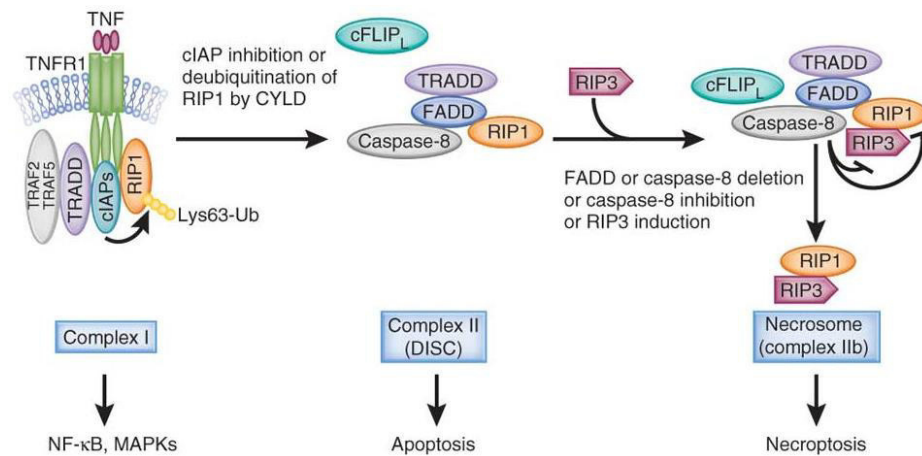
<i>Receptor</i>	<i>Ligando</i>	<i>Adaptadora</i>
<i>CD95, FAS o (APO1)</i>	FASL	FADD
<i>TNFR1</i>	TNR $\alpha$	TRADD, TRAF2
<i>DR3 o TNFRSF25</i>	TNF-like protein 1A	FADD, TRADD
<i>DR4 o TRAIL receptor 1</i>	TNFSF10/TRAIL	FADD
<i>DR5 o TRAIL receptor 2</i>	TRAIL	FADD



**Figura 13. Activación de Caspasa 8.** Cuando ocurre la interacción de un receptor de muerte, su ligando, y FADD la procaspasa 8 se une y forma el complejo DISC. Sin embargo, en presencia de cFLIP (cellular FLICE inhibitory Protein) la procaspasa 8 no puede ser dimerizada ya que cFLIP comparte una estructura similar a la procaspasa 8 (A). Una vez el estímulo aumenta, cFLIP es reemplazado por otra procaspasa 8 (B) lo que facilita la dimerización (C) y activación de caspasa 8 (D) (Modificado de (Oberst & Green, 2011)).

Por otro lado, la caspasa 8 puede inducir apoptosis a través de TNFR1 (TNF-receptor 1) (Micheau & Rg Tschopp, 2003). Una vez que el TNFR1 es activado mediante la unión de su ligando, este recluta múltiples proteínas para formar estructuras conocidas como complejos. El complejo I está formado por TRADD, TRAF1, RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) y promueve señales de supervivencia y conlleva a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. El complejo II involucra la participación de TRADD, TRAF2, FADD y caspasa 8 (Belizario, Vieira-Cordeiro, & Enns, 2015). Una vez que RIPK1 es desubiquitinizada por CYLD (cylindromatosis) (Galluzzi et al., 2014), en su región Lys63-Ub (Lys63-linked polyubiquitination), crucial para la activación de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) y MAPK (mitogen-activated protein Kinases), se promueve la conversión del complejo I al complejo II, lo que activa caspasa 8 e induce la muerte celular por apoptosis. Si caspasa 8 es bloqueada por cFLIP se forma un heterodímero que permite las modificaciones post-traduccionales asociadas a CIAP1 y CIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis proteins 1 -2) lo cual inhibe la activación de la apoptosis. Por otro lado, si aumenta la expresión de RIPK3 (Receptor Interacting Protein Kinase 3) se activa el complejo IIb (ripososoma), y si cFLIP es

disociada de la procaspasa 8, RIPK1 y RIPK3 se bloquean y la célula muere por apoptosis, si cFLIP inhibe caspasa 8 y RIPK3 se une a MLKL, se forma el necrosoma y ocurre la muerte celular por necroptosis (**Figura 14**) (Han, Zhong, & Zhang, 2011). La muerte celular por necroptosis se detallará más adelante en el capítulo de muerte celular independiente de caspasas.



**Figura 14. Complejo TNFR1.** El complejo I de TNFR1 conlleva a la supervivencia celular a través de la activación de MAPKs y NF- κB. Una vez que RIPK1 es ubiquitinizada la caspasa 8 es activada y promueve la conversión del complejo I en complejo II, lo que induce la muerte por apoptosis. Si caspasa 8 es inhibida por cFLIP y se activa RIPK3 se induce la formación del necrosoma y muerte por necroptosis (Tomada Han et al., 2011).

#### 3.4.1.1.4 Piroptosis.

La piroptosis es un tipo de muerte celular especializada que involucra la dependencia de caspasa 1 y que se encuentra principalmente en células neuronales, células dendríticas y macrófagos, su nombre deriva del griego *Pyros*, calor. (Lamkanfi, 2011). Este tipo de muerte es accionado mediante la interacción de patógenos con receptores de tipo NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors) como NLRC4 (NLR family CARD domain-containing protein 4), NLRP3 y AIM2 (absent in melanoma 2), dependiendo del tipo de microorganismo (Kawai & Akira, 2009) los cuales son encargados de formar una estructura multi-proteica llamada inflamosoma a través de la unión de sus dominios CARD o PYD (Pyrin domain) con las regiones



CARD de procaspasa 1 (Bergsbaken, Fink, & Cookson, 2010). Una vez que se activa caspasa 1 se recluta caspasa 7 y se lleva a cabo el proceso de muerte celular a través de lisis osmótica debido a una hinchazón de la célula, lo cual provoca una liberación del contenido intracelular y liberación de patrones moleculares asociados a daño o DAMP (Damage-associated molecular pattern molecule). Este tipo de muerte comparte varias características con la apoptosis como la condensación nuclear, fragmentación del DNA. Se ha demostrado que ambas son positivas a marcaje con Anexina V y Yoduro de propidio, sin embargo en la apoptosis la Anexina V se une a la fosfatidilserina la cual se encuentra expuesta en la membrana plasmática y en el caso de la piroptosis la Anexina V entra por poros en la membrana uniéndose a la fosfatidilserina que se encuentra en el interior (Bergsbaken et al., 2010; G. Koopman, C.P.M. Reutelingsperger, G.A.M. Kuijten, R.M.J. Keehnen, S.T. Pals, 1994).

Otro tipo especializado de muerte celular regulada dependiente de caspasas es la cornificación la cual ocurre en células de la piel. Esta consiste en la descamación, hinchazón y queratinización de la célula por mecanismos moleculares similares a la apoptosis. Se caracteriza por una liberación abrupta al espacio extracelular de proteasas, nucleasas y transaminasas (Eckhart, Lippens, Tschachler, & Declercq, 2013).

### **3.4.2 Muerte celular independiente de caspasas**

La muerte celular regulada independiente de caspasas (MCR-IC) se divide principalmente en dos subtipos: autofagia y necrosis regulada. Ambas se caracterizan por poseer una maquinaria especializada que desencadena los eventos de manera controlada y sistematizada sin que se vea involucrada la participación de caspasas (Belizario et al., 2015). Entre estos tipos de muerte existen muchas características morfológicas diferentes. Por un lado, la autofagia se caracteriza por la formación de una gran cantidad de vacuolas llamadas fagolisosomas los cuales son cuerpos citoplasmáticos formados a partir de la unión de un fagosoma y un lisosoma (Y. Liu & Levine, 2015). Por otro, la necrosis regulada posee características muy similares a la

necrosis, por lo que por mucho tiempo fue llamada necrosis, utilizado el término como sinónimo (Galluzzi et al., 2014). Este a su vez incluye muchos tipos de muerte como lo son: necroptosis, partanatos, oxytosis, ferroptosis, NETosis, Pironecrosis dependiente de Ciclofilin D o CYPD (cyclophilin D) (**Tabla 8**) (Vanden Berghe et al., 2014).

### **3.4.2.1 Autofagia**

La autofagia es un proceso catabólico que se encarga de la degradación de organelos y componentes citoplasmáticos a través de estructuras en forma de vesícula de doble membrana diseñadas para la degradación de varios constituyentes incluidos organelos citoplasmáticos llamadas autofagosolisosomas. Éstos se forman a través de la fusión de lisosomas y fagosomas por un proceso que es activado en condiciones de inanición celular asociada a deficiencia de nutrientes, condiciones de hipoxia y altas temperaturas como un sistema pro-supervivencia (Xu et al., 2013). Este proceso se divide en varias fases: aislamiento, elongación, y degradación, los cuales requieren de la formación e interacción de diversos complejos como complejo UL1K, Beclina1-VPS34-complejo PI3K clase III, Atg9-Atg2-Atg18 y Atg5-Atg12-Atg16 and Atg8/LC3.

El mecanismo de autofagia se induce a través de la deficiencia de aminoácidos, lo cual promueve la activación de vías de señalización como fosfatidil-inositol III (PI3), mTOR, JNK y la activación de proteínas Atg (Autophagy-related protein) como: Atg1–10, Atg12–14, Atg16–18, Atg29, Atg3 (Mizushima, 2007; Xu et al., 2013). La fase de inicio y aislamiento requiere la formación de PAS (pre- autophagosomal structure) a través de la unión de diversos complejos proteínicos como el complejo Atg13-ULK-FIP200 (Roy & Debnath, 2010) y Atg9L1 y Atg12 (Shibutani, Saitoh, Nowag, Munz, & Yoshimori, 2015). Ambos requieren del ensamble del complejo beclina 1 - Vps30 (vacuolar protein sorting 30) y la subunidad de clase III de fosfatidil-inositol 3, localizados en el retículo endoplásmico, así como la acumulación en el retículo endoplásmico de Atg14, SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor–attachment protein receptor'), Atg2 y proteínas de la familia WIPI para formar el complejo Atg14L (Proikas-Cezanne & Pfisterer, 2009). Estas a su vez interactúan con el complejo Atg12, Atg16, Atg5 (Walczak & Martens, 2013) y sistema LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) (Shibutani et al., 2015), lo que permite la elongación y aislamiento de la vesícula.



La autofagia a su vez también está implicada en la regulación de otras vías de muerte celular, ya que se ha observado que ésta puede regular la inhibición de apoptosis a través de la unión de dominios BH3 de proteínas anti apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL y beclina-1 (Mizushima, 2007). Así como también la apoptosis puede inducir la autofagia mediante la interacción de caspasas y proteínas pro-autofágicas como Atg5 y Atg 12 (Yousefi et al., 2006). Por otro lado se ha observado que la autofagia puede inhibir necroptosis al degradar RIPK1, así como también promoverla mediante la formación del necrosoma-autofagosoma por la unión de Atg5-FADD/RIPK1/RIPK3 (Y. Liu & Levine, 2015; Nikolettou, Markaki, Palikaras, & Tavernarakis, 2013). Sin embargo, otro motivo de controversia es que en algunos estudios demuestran que la autofagia sólo está presente en estadios de agonía temprana y que depende de otros mecanismos de muerte, lo que difiere con la definición de autosis, por lo que existe una disyuntiva en el uso de este término como un tipo de muerte celular propiamente. La NCCD ha descrito la autofagia como un término que implica un tipo de muerte celular que puede ser inhibida al utilizar inhibidores de autofagia, (Y. Liu & Levine, 2015).

#### **3.4.2.2 Necrosis regulada**

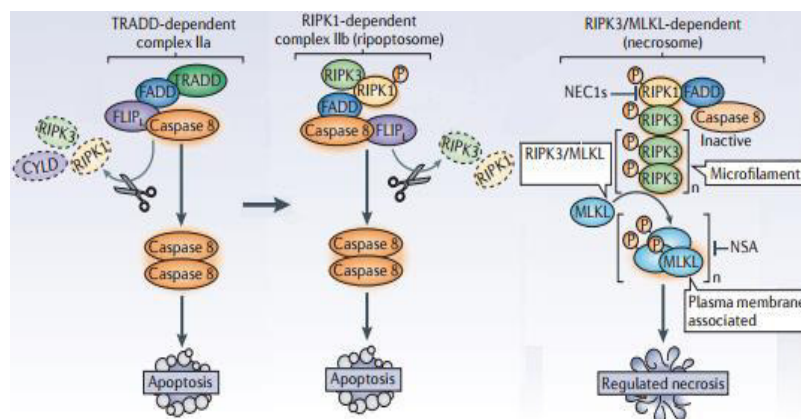
La necrosis regulada es un tipo de muerte celular que al igual que la dependiente de caspasas (apoptosis, piroptosis) posee una maquinaria que con lleva de manera sistemática al proceso de muerte y que difiere de la autofagia por sus características morfológicas (Belizario et al., 2015). Existen diversos tipos de necrosis regulada, la más estudiada de ellas es la necroptosis, la cual se divide en vía intrínseca y extrínseca.

##### **3.4.2.2.1 Necroptosis**

La necroptosis posee características morfológicas similares a la oncosis (necrosis no regulada) pero a diferencia de ésta, la necroptosis posee un alto sistema de regulación dependiente de proteínas RIP (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase), ésta puede ser clasificada en extrínseca e intrínseca.

#### 3.4.2.2.2 Vía extrínseca

La vía extrínseca requiere de un estímulo externo a través de receptores TNF como TRAIL, FAS, TWEAK, (Galluzzi et al., 2014), y la formación del complejo I, el cual requiere la participación de moléculas, como TRADD (TNF receptor 1-associated death domain) TRAF1 (TNF receptor (TNFR) associated factor), RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1). Como se mencionó anteriormente en el apartado de apoptosis extrínseca, caspasa 8 puede inducir apoptosis a través de la disociación de RIPK1 y RIPK3 y degradación de IAPs (complejo IIa) o por la formación del ripoptosoma y la presencia de cFLIP (complejo IIb) (Han et al., 2011; Mahoney et al., 2008; Tenev et al., 2011). Cuando caspasa 8 se encuentra inhibida, RIPK1 y RIPK3 son auto y transfosforiladas, lo que activa proteínas como CrmA (cytokine response modifier protein A) o vIRA (viral inhibitor of RIP activation) y MLKL (mixed lineage kinase domain-like) lo conlleva a la formación de microfilamentos y un complejo llamado necrosoma (**Figura 16**) (Galluzzi et al., 2014). MLKL es la responsable de que la célula adquiera el fenotipo de muerte celular accidental debido a que produce una alteración en la continuidad de la membrana plasmática al formar poros y canales por donde el flujo de  $\text{Na}^+$  aumenta dentro de la célula, conduciendo a un desbalance en la presión osmótica que conlleva a una gran entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que provoca la pérdida de la función mitocondrial y la consecuente liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés reactive oxygen species), provocando un colapso en el gradiente electroquímico que afecta la cadena transportadora de electrones. Todo esto finalmente conduce a la pérdida irreversible del potencial de membrana mitocondrial, lo que conlleva a una hinchazón de la célula y la expulsión de moléculas altamente inmunogénicas llamadas DAMPs o patrones moleculares asociados a daño y contenido intracelular al espacio extracelular (Belizario et al., 2015).



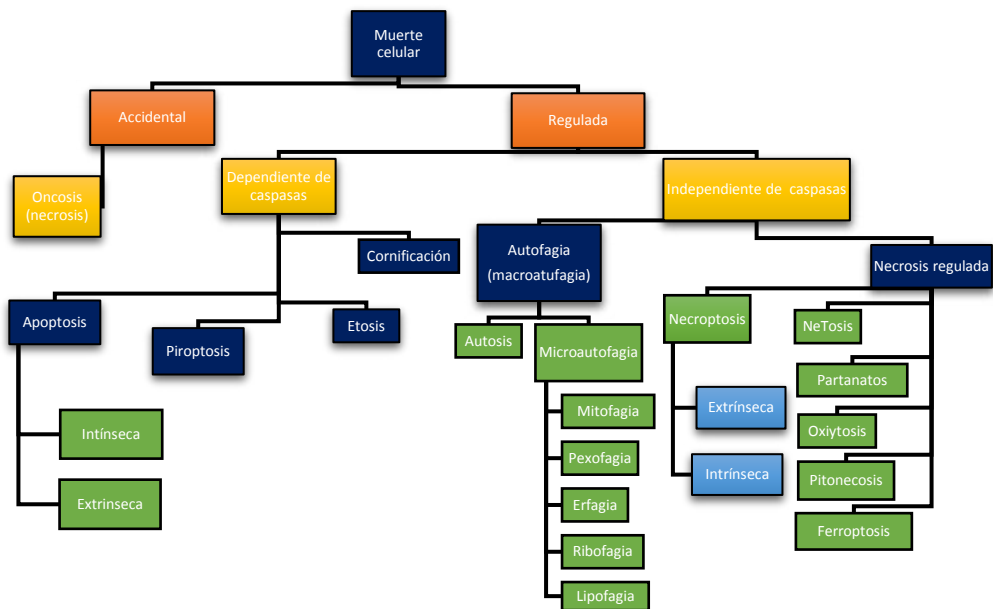
**Figura 16. Complejo IIa, Complejo IIb (rioptosoma) y necrosoma.** El complejo IIa o TRADD dependiente induce apoptosis a través de la disociación de RIPK1. El complejo IIb o ripoptosoma depende de la presencia de RIPK1, la cual en ausencia de FLIP activa caspasa 8, induciendo apoptosis. El necrosoma se activa en presencia de RIPK1, RIPK3 y MLKL (Modificado de Vanden Berghe et al., 2014).

### 3.4.2.2.3 Vía intrínseca

La vía intrínseca requiere de la interacción de PGAM5L y PGAM5S, dos proteínas fosfatasa que causan la activación de Drp1 (dynamin-related Protein 1) y su traslocación a la mitocondria independiente de RIPK1 y RIPK3, a través de procesos oxidativos TBH (*tert-Butyl hydroperoxide*) (Z. Wang, Jiang, Chen, Du, & Wang, 2012). Este proceso de fusión es regulado a su vez por MFN-1 y MFN-2 (mitofusin-1 y mitofusin-2) y OPA1 (optix atrophy 1). Drp1 se une a Fis1 y Mff e induce fragmentación mitocondrial, sin embargo el citocromo c no es liberado como en la apoptosis (Belizario et al., 2015).

**Tabla 8. Tipos necrosis regulada emergentes.**

<i>Necrosis reguladas emergentes</i>	<i>Características</i>
<i>Ferroptosis</i>	Este tipo de muerte se produce por una falla en el sistema Xc-Cys/Glu que no permite la quelación del hierro intracelular mediante un aumento en la producción de ROS a través de la inhibición de glutatión (GSH) y pérdida de a función de GPX4, lo que genera estrés oxidativo, peroxidación de lípidos, entrada de Ca <sup>2</sup> y muerte celular.
<i>Oxytosis</i>	Este tipo de muerte se produce cuando el sistema Xc – Cys/Glu es inhibido por un exceso de Glu, lo que reduce los niveles intracelulares de ICys requeridos para la síntesis de glutatión (GSH), y activa 12 y 15 lipoxigenasa (LOX12) y LOX15 e inicia una producción de ROS, lo que produce un incremento en el GMP cíclico, abriendo canales de cGMP en la membrana plasmática permitiendo la entrada de Ca <sup>2</sup> posteriormente se activa de la cascada de catepsinas-calpainas, lo que induce permeabilización de la membrana lisosomal o LMP (lysosomal membrane permeabilization).
<i>Partanatos</i>	Este tipo de muerte involucra la participación de PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase), una enzima que transfiere grupos ADP-ribosa, la cual es inactivada durante la apoptosis. PARP1 induce la liberación de tAIF (truncated apoptosis-inducing factor) en la membrana mitocondial externa, lo que es asociado al desbalance en la producción de ROS y Ca <sup>2</sup>
<i>NETosis</i>	NOX1 es un metabolito de la familia NOX (NADPH oxidase family) que induce producción de ROS principalmente en neutrófilos, eosinófilos y células cebadas. La producción de ROS induce la liberación de NET (neutrophil extracellular traps) los cuales están compuestas de resto de cromatina e histonas, se considera un tipo de ETosis, sin embargo esta no requiere activación de caspasas ni actividad de RIPK1.
<i>Pironecrosis</i>	Este tipo de muerte celular es Independiente de caspasa 1 y 11, pero dependiente del componente ASC (apoptosis-associated speck- like protein containing a CARD) del inflamosoma y de la proteína CTSB (cathepsin B), lo que resulta en la liberación de citocinas pro-inflamatorias y del mediado HMGB1 (high mobility group box 1) proceso que resulta en la muerte celular.
<i>CYPD</i>	Ciclofilin D regula la apertura de canales en la transición de le permeabilidad mitocondrial o MPT (Mitochondrial permeability transition) facilitando la translocación de NAD de la membrana interna mitocondrial al citoplasma, lo que induce una liberación de calcio del retículo endoplásmico y producción de ROS.



**Figura 17. Tipos de muerte celular y sub tipos de muerte celular.**

### 3.4.3 Muerte celular y cáncer

Como se ha mencionado a lo largo de estos capítulos, la resistencia a la muerte celular regulada es una de las características más importantes implicadas en la resistencia de las terapias convencionales quimioterapéuticas (Martinez-Torres et al., 2015; Schmidt et al., 2004). Esta resistencia es ocasionada principalmente a mutaciones en proteínas que regulan la apoptosis como FAS, TRAIL, p53, proteínas de la familia Bcl-2, caspasas (Hassan et al., 2014; Otten, van Ginkel, Hagenbeek, & Petersen, 2004; Willers et al., 2013). Así como sobre expresión de IAP y otras proteínas anti-apoptóticas (Hassan et al., 2014). Por lo que es necesario encontrar alternativas y terapias complementarias que nos permitan evadir este mecanismo de resistencia.



### **3.5 Nanopartículas de oro.**

Las nanopartículas de oro son estructuras metálicas con un diámetro que oscila entre 1 y 100 nanómetros (X. Huang & El-Sayed, 2010), Poseen características físico-químicas que las convierten en nanomateriales altamente rentables en diversas áreas de investigación (A. Wang et al., 2014). Entre sus áreas de estudio se encuentra la electrónica, mecánica y recientemente el área biomédica (Radhakrishnan, Suni, Bever, & Hammock, 2014), donde se ha observado que poseen distintas aplicaciones debido a su estructura, su fácil síntesis y su agente de superficie (A. Wang et al., 2014). Dentro de sus propiedades biológicas se ha reportado su efecto sobre microorganismos patógenos resistentes a fármacos antimicrobianos (Li et al., 2014), además de que poseen una estructura que les permite ser cargadas con cualquier tipo de ligando (anticuerpos, péptidos, DNA, grupos funcionales) (Subinoy Rana, Avinash Bajaj, Rubul Mout, 2013), así como también una alta biocompatibilidad con el tejido sano (Murugan, Anthony, Jeyaraj, Rathinam, & Gurunathan, 2014), lo que ha permitido que éstas puedan ser utilizadas en modelos biológicos. Recientemente se ha visto que poseen un potencial efecto antitumoral el cual depende de diversas características, una de ellas es su efecto fotoconductor (X. Huang & El-Sayed, 2010), su capacidad de distribuirse en regiones anatómicas de difícil acceso como la médula ósea (Sukhija, Kamath, Babshet, Srikanth, & Bajoria, 2015), así como también la capacidad de inducir muerte celular regulada en algunos tipos de células tumorales dependiendo de su tipo de síntesis, tamaño y agente de superficie (M. Liu et al., 2013), lo que las convierte en una alternativa para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer (Jain, Hirst, & O'Sullivan, 2012).

#### **3.5.1 Síntesis.**

Los métodos de síntesis de nanopartículas se agrupan en dos categorías, las aproximaciones «de arriba hacia abajo» y las «de abajo hacia arriba». La primera consiste la reducción de sólidos en porciones más pequeñas mediante diversos procesos como: evaporación térmica, depósito químico en fase vapor, preparación de clusters gaseosos, implantación de iones, molienda de partículas, los cuales requieren de instrumentos complejos, complicados y costosos. Por otro, lado los métodos «de abajo hacia arriba» consisten en la elaboración de nanopartículas a través de dos formas:

división de sólidos mediante volatilización y condensación en fase gaseosa y soluciones (Zanella, 2012). La síntesis química, coloidal o método de Turkevich es un tipo de condensación en solución, la cual consiste en la integración de un agente precursor metálico de baja concentración en una solución acuosa a temperatura de ebullición del agua, junto con un agente reductor y un agente estabilizador (Kimling et al., 2006). Como agente precursor se utiliza el ácido tetracloroaurico [ $\text{H}(\text{AuCl}_4)$ ] y como agente reductor pueden utilizarse diversos agentes químicos ya sea de estructura orgánica o inorgánica como lo son el ácido cítrico y sus respectivas sales principalmente, formaldehído, solución acuosa de metanol, clorhidrato de hidroxilamina, borohidruro de sodio, peróxido de hidrógeno, glucosa, fósforo, monóxido de carbono, hidrógeno, entre otros, participan en el proceso de óxido-reducción; y agentes protectores que actúan como estabilizantes, principalmente el poli etilenglicol (PEG), el alcohol polivinílico (PVA), poliacrilato de sodio, y polivinilpirrolidina (PVP) (Corzo Lucioni, 2012). Las características fisicoquímicas de las nanopartículas de oro son de crucial importancia ya que se ha observado en diversos estudios que la actividad biológica de las AuNP depende de su estructura, tamaño y forma, las cuales se han visto directamente dependientes de la concentración del agente precursor y de la naturaleza del agente reductor (Jain et al., 2012; Paino et al., 2012; Verma, Singh, & Chavan, 2014).

### **3.5.2 Uso de nanopartículas de oro y cáncer.**

Como se mencionó anteriormente, el cáncer es una enfermedad multifactorial que posee muchos mecanismos con los cuales inhibe la acción de las quimioterapias. En estudios recientes se ha observado que las nanopartículas de oro reducidas con citrato de sodio con un tamaño entre 5 a 100 nm son capaces de inducir efectos sobre metástasis, al regular proteínas como SNAIL, E-Cadherina, Vimentina, Twist, las cuales están asociadas a un proceso llamado transición epitelio mesenquimal (MET) que permite a la célula desprenderse y migrar (Arvizo, Saha, Wang, Robertson, & Bhattacharya, 2013). Otra de sus características es que AuNP sintetizadas a base de PEG como agente reductor con un tamaño entre 5 a 50 nm son capaces de inhibir vías de señalización de proliferación como PI3/Akt, a su vez se ha observado que estas son capaces de sensibilizar a las células tumorales a las quimioterapias convencionales (Kaushik et al., 2016). Otro de los mayores problemas en el tratamiento de algunos tipos de cáncer es la

dificultad que existe de administrar los tratamientos y que éstos lleguen hasta su sitio diana, esto principalmente debido a la naturaleza del fármaco o a las condiciones fisiológicas y anatómicas. En otro ensayo se observó que el uso de AuNP de uso comercializado (West Chester, PA, USA) entre 20 y 100 nm son estables en el pH sanguíneo, no inducen citotoxicidad en riñón, ni en hígado al inyectarse vía endovenosa (J. H. Kim, Kim, Kim, Kim, & Yu, 2009), además de que AuNP sintetizadas con dietilipolicarbonato poseen una gran resistencia a enzimas (Dwight S. Seferos, Andrew E. Prigodich, David A. Giljohann, Pinal C. Patel & Proximity, 2011) y que AuNP con PEG de 5 nm pueden llegar a regiones anatómicas de difícil acceso como cabeza, cuello (Sukhija et al., 2015) y hueso, además de que AuNP reducidas con citrato en un tamaño de 20 nm favorecen la regeneración de este mediante la inducción de ontogénesis (Yi, Liu, Fong, Zhang, & Yang, 2010), por lo que podrían ser de utilidad en algunos tipos de cáncer que derivan de daños en la médula ósea como las leucemias. A su vez, éstas tienen una gran capacidad como acarreadores de fármacos lo que permite llevar a cabo terapias al cargadas con anticuerpos (Eck et al., 2008), DNA, o péptidos (Jain et al., 2012). Otra de sus características es que pueden ser utilizadas para diagnóstico mediante imagen, al ser marcadas y dirigidas contra el tumor (Reuveni, Motiei, Romman, Popovtzer, & Popovtzer, 2011). Sin embargo, una de sus propiedades de mayor interés es la inducción de muerte celular.

### **3.5.3 Nanopartículas de oro y su efecto sobre la muerte celular.**

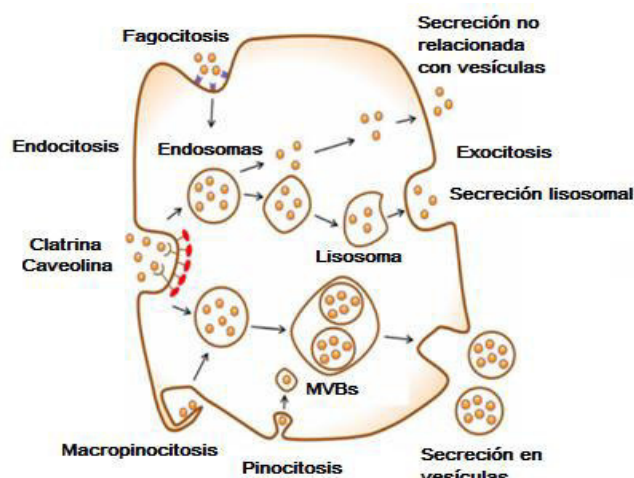
Una de las más importantes características de las células cancerosas es su capacidad de evadir la muerte celular ya que está directamente relacionada con la carcinogénesis, resistencia a los tratamientos, y reincidencia de los tumores (Gemma Kelly, 2007). En la actualidad, la mayor aplicación experimental de AuNP sobre la inducción de muerte celular e inhibición de crecimiento tumoral es mediante el uso de sus propiedades fototérmicas. En diversos estudios se ha demostrado que las AuNP sensibilizan a las células cancerosas debido a que éstas absorben la radiación, potencializando su efecto citotóxico debido a la hipertermia, reduciendo considerablemente el tamaño del tumor (Abadeer & Murphy, 2016; X. Huang & El-Sayed, 2010), además de que pueden inducir la muerte mediante mecanismos regulados o de forma accidental (Abadeer & Murphy,

2016). Por otra parte se observado que las AuNP desnudas pueden inducir diferentes mecanismos de muerte celular. Estudios realizados en algunas líneas celulares de cáncer concluyen que las AuNP pueden inducir apoptosis a través de la regulación de mRNA de p53, bax, Caspasa 8 y 9, así como genes bcl-2 y anti-apoptóticos (Baharara et al., 2016; M. Liu et al., 2013; Selim & Hendi, 2012). En otros se ha observado que pueden inducir muerte de forma necrótica o necrosis regulada como necroptosis o autofagia (Chueh, Liang, Lee, Zeng, & Chuang, 2014; M. Liu et al., 2013; Pan et al., 2009), mediante su capacidad para aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno e inducir daño en la membrana mitocondrial (M. Liu et al., 2013; Pan et al., 2009; Piryazev, Azizova, Aseichev, Dudnik, & Sergienko, 2013). Otra de sus propiedades es su capacidad de inducir muerte en células madre cancerosas o CSC (cancer stem cell). Se demostró que nanopartículas conjugadas con antineoplásicos tienen un efecto citotóxico en CSCs y reducen a su vez la capacidad enriquecedora del microambiente tumoral así como la iniciación de la actividad tumoral (Kaushik et al., 2016).

#### **3.5.4 Interacción entre AuNP y las células.**

Como se mencionó anteriormente, los efecto biológicos de las AuNP dependen principalmente del tipo de síntesis, el agente precursor y su agente reductor (Xia, Kovochich, Liong, Zink, & Nel, 2008b). Recientes estudios evaluaron el tipo de interacción entre AuNP en células sanas y tumorales, donde se observó que las AuNP difieren de su capacidad de penetración y afinidad a la célula dependiendo del tipo de célula, concentración y tipo de agente reductor empleado para su síntesis (Connor, Mwamuka, Gole, Murphy, & Wyatt, 2005). Demostrando que las AuNP tienen menor penetración en células sanas, así como menor efecto citotóxico (Boyles et al., 2015; Paino et al., 2012), y que las de un tamaño menor a 10 nm penetraban más rápido a células cancerosas (Xia et al., 2008), así como también tienen un mayor efecto citotóxico dependiente de la concentración y porcentaje de penetración (Arvizo et al., 2013; Xia, Kovochich, Liong, Zink, & Nel, 2008a). También se observó que AuNP de un tamaño menor a 50 nm son capaces de entrar a la célula mediante endocitosis mediada por proteínas tipo caveolas, mientras que AuNP de alrededor de 100 nm entran mediante receptores tipo clatrina, lo que puede determinar el efecto que inducen en la célula, así como el tipo de transporte y localización (Xia et al., 2008), el cual puede ser

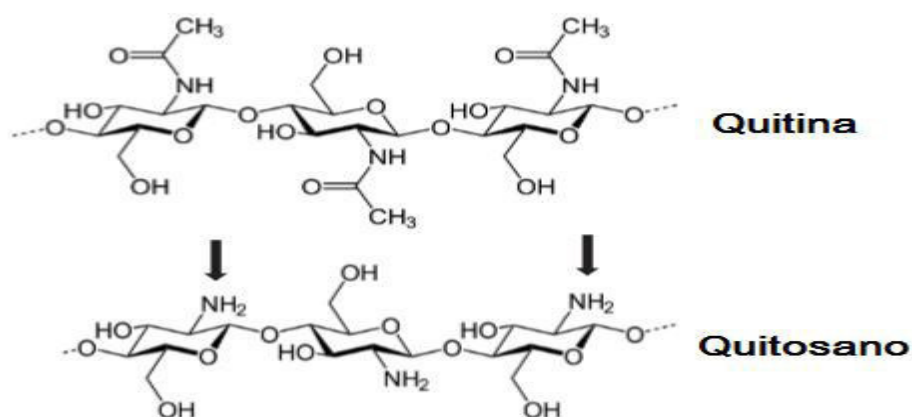
mediante endosomas, lisosomas, o en endosomas multivesiculares o MVBs (multivesicular body) (Oh & Park, 2014; Xia, Kovochich, Liong, Zink, & Nel, 2008). Por otro lado, se observó que en células fagocíticas las AuNP con un tamaño mayor a 100 nm entran por fagocitosis, pinocitosis o macropinocitosis, y son eliminadas por exocitosis mediante secreción en vesículas, sin vesículas, y por lisosomas (**Figura 18**) (Chithrani & Chan, 2007; Oh & Park, 2014). En otros estudios se vio que las AuNP pueden formar complejos de mayor de tamaño al interactuar con el medio de cultivo celular o el plasma (Maiorano et al., 2010), formando una corona de proteínas que determinan el tipo de interacción con la célula y la vía de entrada (Cheng et al., 2015). Las AuNP que poseen una corona de proteínas de menor grosor son las que poseen mayor penetración y citotoxicidad, esto está relacionado con el tipo de medio de cultivo en donde son suspendidas y el tipo de agente reductor. Las AuNP sintetizadas a partir de agentes reductores catiónicos son las que tienen mayor penetración y citotoxicidad en células cancerosas, así como mayor biocompatibilidad y menor efecto citotóxico en células sanas (Boyles et al., 2015; Paino et al., 2012; Xia et al., 2008).



**Figura 18. Vías de interacción de células y nanopartículas.** Las AuNP pueden interactuar con la célula mediante receptores clatrina o caveolina en nanopartículas menores a 100 nm. Partículas de un tamaño mayor a 100 nm se ha observado que pueden penetrar en la célula vía fagocitosis, macropinocitosis, pinocitosis, además de que son transportadas mediante endosomas o liposomas y eliminadas mediante exocitosis a través de vesículas o secreciones no relacionadas a vesículas (Modificado de Oh & Park, 2014).

### 3.6 Quitosano

El quitosano es un polisacárido de carácter catiónico producto de la desacetilación parcial de la quitina (Colina et al., 2014), la cual se encuentra de forma abundante en la naturaleza, principalmente en la pared de algunos crustáceos y hongos (Younes & Rinaudo, 2015). Posee una estructura formada por dos cadenas lineales de monómeros glucopiranosas unidas por enlaces  $\beta$  glucanos (Poli [ $\beta$ -(1-4)-2 acetamida-2-desoxi-D-glucopiranososa] o N-acetil-D-glucos-2-amina) (Zargar, Asghari, & Dashti, 2015). Este polímero una vez sometido a un proceso de desacetilación química, en condiciones de alta temperatura ( $> 60^\circ$ ) y medio alcalino (NaOH), pierde el grupo acetoamida del carbono número 2, dejando un grupo amino (**Figura 19**) (Colina et al., 2014). Debido a que el quitosano posee una estructura con una gran similitud a la celulosa, el biopolímero más abundante localizado en la pared de las células vegetales, éste posee una alta biocompatibilidad (Gacén & Gacén, 1996). El peso molecular, el grado de desacetilación y su distribución afectan las propiedades físicas y químicas del quitosano (Sun et al., 2009; Tsaih & Chen, 1999), como la versatilidad, la cual depende de la alta reactividad química y la distribución de los grupos amino, al igual que la solubilidad, ya que el quitosano es insoluble en agua, por lo que requiere la protonación de los grupos amino libres, lo cual permite el cambio de sal a solución (Rinaudo, Pavlov, & Desbrières, 1999). Otra de las características del quitosano es que su carga positiva permite la solubilidad en medios ácidos y en soluciones neutras, así como también le otorga una capacidad bioadhesiva que le permite ligarse a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas, lo que facilita el transporte de principios activos polares a través de las superficies epiteliales, convirtiéndolo en un material biocompatible, estable, y biodegradable (Zargar et al., 2015).



**Figura 19. Estructura de la quitina y quitosano.** La quitina posee un grupo acetamida en el carbono 2, el cual es sustituido por un grupo amino en condiciones de alta temperatura y medios alcalinos, proceso llamado desacetilación, el cual conforma la estructura del quitosano (flechas) (Tomado de Zargar, Asghari, & Dashti, 2015).

### 3.6.1 Aplicaciones del quitosano.

Las aplicaciones del quitosano son abundantes, abarcan diversas áreas como la industria cosmética, textil, alimentaria y biológica (M. O. Kim et al., 2013). Dentro de las aplicaciones biológicas que posee el quitosano se encuentra su efecto como antimicrobiano (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010), efecto sobre los ácidos grasos (Wydro, Krajewska, & Hąc-Wydro, 2007), un efecto modulador de la respuesta inmunológica (Vasconcelos et al., 2015), y propiedades antitumorales (Kumar et al., 2014). Éste se ha empleado de forma soluble (M. O. Kim et al., 2013), o en forma de nanopartículas, ya sea acarreado o encapsulando fármacos (Kumar et al., 2014). En estos estudios se ha observado que el quitosano puede inhibir la proliferación celular por la inhibición de la vías de señalización como Akt, JNK, y MAPK (Boyles et al., 2015; M. O. Kim et al., 2013), también se ha visto que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral e inducir muerte celular regulada por apoptosis, modulando principalmente la expresión de proteínas de la familia bcl-2 (M. O. Kim et al., 2013), y caspasa 3 (Dass & Choong, 2008). Se ha observado que el efecto citotóxico sobre células de cáncer no está mediado por el tipo de interacción con la célula, el cual puede ser mediante endocitosis mediada por receptores de membrana tipo clatrina, caveolina, o TLR4 (Choi et al., 2012; Garaiova et al., 2012). Por otro lado, el peso molecular y el

grado de desacetilación pueden determinar las propiedades biológicas como el porcentaje de penetración y citotoxicidad en células de cáncer (M. Huang, Khor, & Lim, 2004).

### **3.6.2 Quitosano y nanopartículas de oro**

Como se ha mencionado previamente, las AuNP han demostrado tener muchas propiedades que pueden potencializarse o reducirse dependiendo del tipo de agente reductor utilizado. En algunos estudios se ha utilizado el quitosano como agente reductor, debido a que se ha observado que los reductores de carácter catiónico confieren una mayor citotoxicidad en células de cáncer y mayor biocompatibilidad con las células sanas (Xia et al., 2008b). Las AuNP cubiertas con quitosano han demostrado ser estables y seguras como biomaterial (Rampino, Borgogna, Blasi, Bellich, & Cesàro, 2013), además han sido utilizadas como diagnóstico para medir los niveles de algunas sustancias en sangre, debido a sus propiedades químicas selectivas (Chen, Wang, Chen, Xu, & Liu, 2013), también se ha evaluado su comportamiento en algunas líneas celulares como de ovario de hámster, donde se ha visto que tienen bajo efecto citotóxico (Boca et al., 2011). Otros estudios demuestran que AuNP qts pueden regular la respuesta inmune a través de la expresión de mRNA de CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) (Boyles et al., 2015). Así como también se observó que pueden inducir muerte celular en una línea de cáncer de pulmón (Choi et al., 2012).



#### IV. JUSTIFICACIÓN

La leucemia es un grave problema de salud pública debido a su alta tasa de mortalidad y morbilidad (INEGI, 2013). Se ha observado que existe un mayor porcentaje de personas que presentan resistencias a los tratamientos convencionales debido a características de las células cancerosas, principalmente una evasión a la muerte celular regulada (Gemma Kelly, 2007). Diversos estudios han demostrado que tanto las nanopartículas de oro (AuNP) (X. Huang & El-Sayed, 2010), como el quitosano poseen potenciales propiedades anti tumorales (Dass & Choong, 2008). En algunos estudios se ha evaluado el efecto de AuNP donde se utiliza el quitosano como agente reductor en algunas líneas de células sanas y una línea de cáncer, obteniendo resultados controversiales en cuanto citotoxicidad y efectos (Boyles et al., 2015; Choi et al., 2012). Por lo que se en este estudio se buscó estudiar el efecto de la síntesis de nanopartículas de oro cubiertas con quitosano (AuNP qts), sobre la muerte celular en líneas celulares de leucemia mieloide crónica, k562, y leucemia linfoide aguda, Jurkat, así como también células mononucleares de sangre periférica (PBMC), como control. Con el fin de generar conocimiento y ofrecer una nueva alternativa a futuro para el tratamiento contra este y otros tipos de cáncer.

## **V. HIPÓTESIS**

las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano inducirán muerte celular regulada dependiente de caspasas en células leucémicas k562 y Jurkat.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el mecanismo de citotoxicidad inducido por nanopartículas de oro cubiertas con quitosano en células leucémicas k562 y Jurkat.

### **6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener nanopartículas de oro cubiertas con quitosano de 10 nm.
- Determinar el efecto sobre muerte celular y daño mitocondrial de nanopartículas de oro cubiertas con quitosano en líneas leucémicas k562 y Jurkat.
- Determinar el efecto de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano sobre el ciclo celular de células en líneas leucémicas k562 y Jurkat.
- Evaluar el efecto de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano sobre linfocitos sanos estimulados con Concanavalina A.
- Determinar la dependencia de caspasas en células leucémicas Jurkat y K562 tratadas con nanopartículas de oro cubiertas con quitosano.

## **VII. METODOLOGÍA**

### **7.1 Síntesis de AuNP cubiertas con quitosano y AuNP de citrato de sodio.**

Se sintetizaron nanopartículas de oro cubiertas con quitosano mediante síntesis química, este proceso consiste en la reducción de un agente precursor (ácido cloroáurico) y un agente protector/estabilizador (quitosano). Para ello se utilizó quitosano peso molecular medio (150-700 kDa), al 2% (Sigma-Aldrich), previamente disuelto en ácido acético al 98% y diluido en un volumen de 10 ml, esta solución fue almacenada durante 24 horas, cubierto con parafilm y en agitación. Posteriormente se realizó una solución con ácido cloroáurico a una concentración de 2mM con una relación de 3:1, (3 ml de ácido cloroáurico por 1ml de quitosano), obteniendo un volumen final de 16 ml (4 ml de quitosano y 12 de ácido cloroáurico), este se coloca en una plancha a temperatura estable a 100°C +/- 5 °C durante 15 min hasta que la solución cambie a color vino, posteriormente se coloca la solución en una placa magnética y se deja en agitación cubierta con una película de parafilm durante 24 horas. Luego se diluyen las AuNP qts en medio de cultivo celular RPMI pH 7.4, (Roswell Park Memorial Institute médium) suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB) (CORNING Cellgro®), en una relación 1:1. Posteriormente fueron filtradas dos veces para quitar el exceso de fibras de quitosano y fueron caracterizadas. Para la síntesis de nanopartículas de oro utilizando citrato de sodio (AuNP Cs) se utilizó una solución de citrato de sodio y una solución de ácido cloroáurico 2mM. El ácido cloroáurico es colocado en vaso de precipitado sobre una plancha precalentada a 105°C +/- 5°C durante 10 minutos, el citrato de sodio es agregado por goteo lento en una relación 2:1 (1 ml de citrato de sodio por 2 ml de ácido cloroáurico), hasta que cambie de color, luego se dejan en agitación y se cubren con parafilm durante 24 horas.

## **7.2 Caracterización de AuNP cubiertas con quitosano y AuNP de citrato de sodio.**

Una vez sintetizadas ambos tipos de nanopartículas de oro se midió el plasmón de resonancia, el cual permite confirmar que se hayan obtenido nanopartículas de oro. Ya que esta es una propiedad que presentan algunos materiales metálicos como el oro, cuando se encuentran en forma de estructura nanométrica. Este ensayo se realizó mediante espectroscopia de luz ultravioleta visible (Uv-vis), utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000c). Para medir el tamaño y potencial Z de las AuNP se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) mediante un analizador de la distribución de tamaños de partículas en suspensión Nanosizer (Zetasizer Nano ZS, Malvern). Para ambos parámetros se realizaron diluciones de las nanopartículas de oro 1/100, 1/1000 y 1/10000 en agua mili Q. Una vez realizadas las diluciones se tomó la muestra correspondiente 1/10000 y se realizaron las lecturas en el Nanosizer. El tamaño se obtuvo al cuantificar la dispersión de la luz provocada por la velocidad y movimientos aleatorios de las partículas (movimiento browniano). Finalmente se midió el potencial Z, una medición muy importante con la que podemos determinar la fuerza de repulsión entre las partículas, lo que nos permite saber si éstas tienden a aglomerarse o a diluirse en una solución. Las mediciones de tamaño y potencial Z y pH se realizaron antes y después de ser diluidas en RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium) suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB) (CORNING Cellgro®).

## **7.3 Vehículos**

Para evaluar el efecto del quitosano y el ácido cloroáurico como vehículos se hicieron soluciones a partir de los procedimientos anteriormente descritos para mantener las mismas proporciones en las que se encuentran en la síntesis de AuNP qts. Para la preparación del quitosano se utilizó quitosano en polvo de peso molecular medio al 2% diluido en ácido acético al 4%, el cual se dejó en agitación por 24 horas y cubierto con una película de parafilm. Posteriormente el quitosano se diluyó en agua mili Q en una proporción de 3:1, donde se colocaron 12 ml de agua mili Q y 4 ml de quitosano al 2%. Posteriormente se diluyeron en RPMI en una relación 1:1. Para evaluar el ácido

cloroáurico se siguió un procedimiento similar, sustituyendo el quitosano por agua mili Q en una relación 3:1, donde se usaron 12 ml de ácido cloroáurico y 4 ml de agua mili Q, esto para mantener las mismas proporciones que tienen en la síntesis de las AuNP qts.

#### **7.4 Mantenimiento de la línea celular**

Para este proyecto se utilizaron dos líneas celulares de leucemia, una de leucemia mieloide crónica (k562) y otra de leucemia linfocítica aguda (Jurkat). El cultivo celular se llevó a cabo según el protocolo estándar Cell Growth Protocol for Jurkat cell line de la American Type Culture Collection (Reddy & Transfer, 2008). Se mantuvieron en medio de cultivo celular RPMI (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino 10% (SFB) (CORNING Cellgro®), 1% de penicilina, estreptomicina, neomicina (PEN) (GIBCO®), incubadas a 37 °C con una atmósfera controlada de 5% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **7.5 Extracción de células mononucleares de sangre periférica.**

Como control para los experimentos de citotoxicidad se utilizaron células mononucleares de sangre periférica o PBMC (peripheral blood mononuclear cells). Para la extracción de muestra se utilizaron 6 donadores sanos, a los cuales se les extrajo una muestra de sangre la cual fue recolectada en tubos con anti coagulante EDTA (Ethylene diamine tetra-acetate). Para la separación de células por gradiente de densidad se vació la sangre lentamente en tubos Falcon de 50 ml y se realizó una dilución 1:1 en PBS 1X. Luego se preparó un falcon 50 ml con 1/3 de Ficol atemperado (Histopaque®-1077) y 2/3 de la dilución sangre: PBS. Una vez realizada la dilución se centrifugó por 30 minutos a 1600 rpm en una centrifuga plana sin freno. Una vez que las células fueron separadas por gradiente mediante centrifugación y se formaron varias capas celulares, se tomó la población correspondiente a las PMBC. Finalmente las células son contadas y mantenidas en medio.

## **7.6 Ensayos de citometría de flujo**

La citometría de flujo es una técnica que nos permite medir características físicas y químicas de una población celular suspendida en un fluido. Se basa en el uso de luz láser y dispositivos de detección que registran la duración, intensidad y espectro de dispersión de luz mediante un sistema de emparejamiento óptico- electrónico que permite el análisis de características celulares como tamaño mediante un detector de dispersión frontal o FSC (Forward Scatter) y complejidad mediante un detector de dispersión lateral o SSC (Side Scatter), una vez que la luz del láser entra en contacto con células suspendidas en un fluido. Tiene la ventaja de que puede detectar particularidades, ya que evalúa cada evento de forma individual y en tiempo real. Además de que permite utilizar la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia o FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) ya que posee detectores de fluorescencia para el registro de distintos tipos de marcajes.

En este estudio se realizaron diversos ensayos en los que realizó citometría de flujo:

- Exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana celular mediante marcaje AnnV/PI
- Evaluación del ciclo celular mediante marcaje PI
- Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante marcaje TMRE
- Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediante marcaje DCFDA

## **7.7 Evaluación de la exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana celular.**

Para evaluar la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular se utilizó un marcaje de Anexina V-APC (AnnV) y yoduro de propidio (Propidium Iodide o PI). La Anexina V se une a la fosfatidilserina, un fosfolípido ubicado normalmente en la membrana plasmática interna, tiene un rol fisiológico como señal “cómeme” cuando es translocada al exterior de la membrana por la degradación lipídica inducida por la activación de flipasas y scramblasas dependientes de la proteína

Xkr8 (Xk-Related Protein 8), durante los proceso de muerte celular regulada (Mariño & Kroemer, 2013). También se evaluó la permeabilidad de la membrana plasmática usando Yoduro de propidio (PI), un agente intercalante del DNA que en células que mantienen la integridad de su membrana plasmática intacta es impermeable. Por lo que este sólo tiñe células con la integridad de la membrana plasmática perdida, una característica de muerte celular (Brana, Benham, & Sundstrom, 2002).

La evaluación de la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular fue utilizada para cumplir varios objetivos:

- Análisis de la muerte celular en células leucémicas k562 y Jurkat tratados con AuNP qts.
- Análisis de la muerte celular en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tratados con AuNP qts.
- Análisis de la muerte celular en células leucémicas y PBMC tratadas con tratados con AuNP qts, AuNP Cs y vehículos.
- Análisis de dependencia de caspasas utilizando un inhibidor de caspasas, QVD OPh.

### **7.8 Análisis de la muerte celular en células leucémicas k562 y Jurkat tratados con AuNP qts.**

Se sembraron  $5 \times 10^4$  células por contenedor en un volumen de 100 uL en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), éstas fueron tratadas inmediatamente con diferentes concentraciones de AuNP cubiertas con quitosano (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron y se hizo un lavado con PBS 1X, se centrifugaron durante 10 min a 1600 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y se agregó la tinción de Anexina V y Yoduro de propidio (AnnV/PI). Para la preparación de la tinción se realizó un mix en un tubo con buffer de Anexina 1x, Anexina V y Yoduro de Propidio. Una vez colocado el marcaje los tubos fueron abiertos y almacenados a 4°C por 20 minutos, posteriormente se analizaron en el citómetro de flujo (BD Accuri™ C6), mediante la técnica FACS (Clasificación de Células Marcadas por Fluorescencia), utilizando el canal FL-4 (AnnV) y FL2 (PI).



### **7.9 Análisis de la muerte celular en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) tratados con AuNP qts.**

Fueron sembradas  $3 \times 10^4$  células PBMC en un volumen de 100 uL en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), estas fueron tratadas inmediatamente con diferentes concentraciones de AuNP cubiertas con quitosano (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) y mantenidas en condiciones normales de cultivo (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se recuperaron las células mediante lavados con PBS 1X y se centrifugaron 10 min a 1600 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y se agregó la tinción de Anexina V y Yoduro de propidio (AnnV/PI) siguiendo la metodología anteriormente descrita, finalmente se leyeron las muestras en el citómetro de flujo (BD Accuri™ C6).

### **7.10 Análisis de la muerte celular en células leucémicas y PBMC tratadas con AuNP qts, AuNP Cs y vehículos.**

Para este ensayo fueron sembradas el mismo número de células que se emplearon en los ensayos correspondientes a células leucémicas k562 y Jurkat ( $5 \times 10^4$ ) y PBMC ( $3 \times 10^5$ ). De igual manera estas fueron suspendidas en un volumen de 100 uL en placas de 96 contenedores de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), y tratadas inmediatamente con diferentes concentraciones de AuNP cubiertas, AuNP Cs, quitosano y ácido cloroáurico [H (AuCl<sub>4</sub>) a las mismas concentraciones (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) bajo condiciones normales de cultivo (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) durante 24 horas en todos los casos. Posteriormente se recuperaron las células y se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron 10 min a 1600 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y se agregó la tinción de Anexina V y Yoduro de propidio (AnnV/PI) siguiendo la metodología anteriormente descrita, finalmente se leyeron las muestras en el citómetro de flujo (BD Accuri™ C6).

### **7.11 Análisis de dependencia de caspasas utilizando un inhibidor de caspasas QVD.**

Para determinar si la muerte celular inducida por las AuNP qts es dependiente de caspasas, se sembraron  $5 \times 10^4$  células en un volumen de 100 uL en placas de 96 pozos de fondo redondo (Corning Inc. Costar®. USA), y tratadas con un inhibidor de pan-caspasas llamado Q-VD-OPh ( $C_{26}H_{25}F_2N_3O_6$ ), el cual es un inhibidor de alta potencia e irreversible de Caspasas 1, 3, 9, 7 y 8 que posee alta estabilidad en agua y bajo efecto citotóxico. (Caserta, Smith, Gultice, Reedy, & Brown, 2003). El QVD-OPh fue utilizado a una concentración de 1mM de forma directa sobre las células (Kuželová, Grebeňová, & Brodská, 2011), se dejó incubando por 30 minutos a 37° con 5% de CO<sup>2</sup>. Una vez pasó el tiempo de incubación estas fueron tratadas de la siguiente manera: control de células sin ningún tratamiento, control con células con QVD-OPh, tratadas con IC<sub>50</sub> de AuNP qts y células tratadas con QVD-OPh + IC<sub>50</sub> de AuNP qts. Posteriormente se utilizó la tinción AnnV/PI y siguió la metodología descrita en los ensayos anteriores.

### **7.12 Evaluación del ciclo celular**

Para evaluar el ciclo celular se utilizó un marcaje de yoduro de propidio o PI (Propidium Iodide), una molécula fluorescente que actúa como agente intercalante de ácidos nucleicos, propiedad que nos permite teñir el DNA y determinar mediante la intensidad de fluorescencia la fase del ciclo celular de las células marcadas, esto debido a que cada una de las fases del ciclo celular tiene una diferente proporción en la cantidad de DNA. La fase G0/G1 tiene una menor proporción de DNA ya que es una fase de crecimiento previa a la fase de síntesis o fase S, donde el DNA es duplicado, la fase G2/M es posterior a la síntesis por lo que presenta el doble de DNA de la fase G0/G1. Debido a que el PI puede macar DNA y RNA se utilizó una RNAasa A solución en PBS (50 µg/ml). Para este ensayo se sembraron  $5 \times 10^5$  células por condición, en placas de 24 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®. USA), inmediatamente fueron tratadas con la IC<sub>50</sub> de AuNP qts e incubadas durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron las células en tubos Falcon 15 ml, luego fueron centrifugadas a 4°C, 1500 rpm por 10 min. Posteriormente se decantó y se procedió a fijar las células en etanol al

70% (30% de PBS). Luego de ser fijadas las células se mantienen a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora como mínimo. Después son lavadas con 2 ml de PBS por muestra. Posteriormente se agrega un buffer 100  $\mu\text{l}$  por muestra de RNAasa A (50  $\mu\text{g/ml}$  solución en PBS) y es incubado durante 20 minutos a temperatura ambiente, al finalizar el tiempo se agregó 100  $\mu\text{l}$  por muestra de buffer de Ioduro de propidio (50  $\mu\text{g/ml}$  solución en PBS), se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se pasó a leer al citómetro (BD Accuri TM C6 Flow cytometer), el análisis se realizó por FlowJo software.

### **7.13 Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial mediante marcaje TMRE.**

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó el marcaje TMRE (Etil éster tetrametilrodamina), un fluorocromo que en células con potencial de membrana mitocondrial activo es secuestrado. Cuando las mitocondrias pierden su potencial de membrana, el TMRE es liberado de la membrana, lo que produce un cambio en la intensidad de fluorescencia el cual es medido por citometría de flujo. Para este ensayo las células fueron sembradas de la misma forma anteriormente descrita y tratadas con la  $\text{IC}_{50}$  de AuNP qts durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron las células y se hicieron lavados con PBS (100  $\mu\text{l}$  por muestra). Se centrifugaron 10 minutos, 1600 rpm. Se decantaron y se utilizaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer (200  $\mu\text{L}$  de PBS y 4  $\mu\text{L}$  de TMRE por muestra). Se incubaron las muestras por 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después se agregaron 300  $\mu\text{l}$  de PBS por muestra y se centrifugaron 15 minutos a 1500 rpm, se decantó y luego se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Finalmente se pasó a leer al citómetro de flujo por FACS (BD Accuri TM C6 Flow cytometer) en el canal FL-3 y posteriormente se analizó por FlowJo software

#### **7.14 Evaluación del efecto de AuNP cubiertas con quitosano sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).**

Para evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno se utilizó un marcaje DCFDA (dichlorofluorescein diacetate) un reactivo fluorogénico que penetra en la célula y es desacetilado por esterasas en compuestos no fluorescentes, el cual en presencia de especies reactivas de oxígeno es convertido en 2',7'- dichlorofluorescein (DCF), un compuesto altamente fluorescente. Para este ensayo las células fueron sembradas de la misma forma anteriormente descrita y tratadas con la IC<sub>50</sub> de AuNP qts durante 24 horas. Posteriormente se recuperaron las células y se hicieron lavados con PBS (100 µl por muestra), se centrifugaron 10 minutos, 1600 rpm, se decantaron y marcaron con 200 µL de buffer (200 µL de PBS y 0.05 µL (2.4µM) de DCFDA por muestra). Se incubaron las muestras por 20 minutos a 37°C. Finalmente se pasó a leer en el citómetro de flujo (BD Accuri TM C6 Flow cytometer) por el canal FL-1 y posteriormente se analizó por FlowJo software.

#### **7.15 Evaluación de la morfología celular.**

Para evaluar la morfología 2.5x10<sup>5</sup> células leucémicas se sembraron en placas de 24 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®. USA), en un volumen de 500 µl de RPMI. Las cuales fueron tratadas con IC<sub>50</sub> de AuNP qts durante 24 horas. Posteriormente se analizaron bajo microscopia invertida con software Lumenera's INFINITY1-2 CMOS 2.0 MP digital camera. Para evaluar la morfología de los linfocitos se extrajeron células monoculares de sangre periférica de acuerdo al protocolo descrito en el apartado número 5 de la metodología. Y fueron sembradas en placas de 24 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®. USA), 1.5 x 10<sup>6</sup> células en un volumen de 500 µl de RPMI. Posteriormente se recuperó el sobrenadante donde se encontraban los linfocitos, ya que son células no adherentes y se sembraron en placas de 24 contenedores en una proporción 5 x 10<sup>5</sup> las cuales fueron tratadas con AuNP qts a la IC<sub>50</sub> de Jurkat (leucemia linfóide aguda) durante 24 horas. Posteriormente fueron analizadas bajo microscopia invertida con software Lumenera's INFINITY1-2 CMOS 2.0 MP digital camera.

### **7.16 Evaluación del efecto de AuNP cubiertas sobre linfocitos estimulados con un mitógeno.**

Para evaluar el efecto de las AuNP qts sobre linfocitos estimulados con Concanavalina (Con A), una lectina que induce la activación y proliferación de los linfocitos T, se extrajeron PBMC de acuerdo al protocolo descrito en el apartado número 5 de la metodología, las cuales fueron sembradas en placas de 24 contenedores de fondo plano (Corning Inc. Costar®, USA),  $1.5 \times 10^6$  en un volumen de 500  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI. Posteriormente se recuperó el sobrenadante donde se encontraban los linfocitos y fueron sembrados en placas de 24 contenedores en una proporción  $5 \times 10^5$  las cuales fueron tratadas de la siguiente manera: se utilizó un control sin tratamiento, un control Con A 1  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich), células tratadas con AuNP qts con la IC<sub>50</sub> de células leucémicas Jurkat de leucemia linfocítica aguda (30  $\mu$ M), finalmente con AuNP IC<sub>50</sub> + Con A (1 $\mu$ g/ml). Los resultados se midieron a las 24, 48 y 72 horas. El conteo se realizó mediante la técnica de azul tripán y el análisis morfológico mediante microscopio invertido.

### **7.17 Evaluación de la dependencia de Caspasas mediante Western Blot**

Para la evaluación de la expresión de caspasa 3, 8, 9 y P53 se realizó la técnica de Western blot, la cual consiste en el uso de anticuerpos específicos para detectar proteínas de interés, de tal forma que se puede estudiar la presencia y cantidad relativa de la misma. Consiste en varias etapas:

- Extracción y cuantificación de proteínas
- Electroforesis
- Transferencia
- Bloqueo y detección

Se sembraron  $5 \times 10^5$  células en un volumen final de 1 ml, se trataron respectivamente con la IC<sub>50</sub> y fueron incubadas durante diferentes tiempos. Posteriormente las células fueron recuperadas mediante centrifugación (10 min, 1600 rpm), el sobrenadante se

decantó, y el pellet de las células tratadas fue tratado con un buffer de lisis (Triton X-100 Lysis) para proteínas totales durante 30 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugaron para eliminar los restos celulares a 13,000 rpm por 10 min y se almacenó el sobrenadante a -20°. El método de cuantificación utilizado fue el de Lowry, la absorbancia de cada muestra se leyó a 530 nm de longitud de onda en un lector de placas. Para la electroforesis se hizo un gel de poliacrilamida al 12%, cada una de las muestras fue preparada con buffer de carga Laemmli (azul de bromofenol, SDS 4%, glicerol 20%, beta-mercaptoetanol 10% y Tris HCL 0.125 M, pH 6.8) 10 µl de buffer por cada 50 µl de muestra. Posteriormente se cargaron 35 µg de proteína por cada tratamiento. La corrida electroforética se realizó a un voltaje de 100 Vlt por 1 hora 40 min. Posteriormente se separó el gel y se procedió a realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa, esta se realizó a 100 Vlt por 55 minutos. Luego se verificó si la transferencia se llevó a cabo eficientemente colocando la membrana en rojo de Ponceau. El bloqueo de la membrana de nitrocelulosa se realizó con una solución de leche semidescremada al 5% en TBS-tween 0.1% por 1 hora a temperatura ambiente. Para la detección de las proteínas se incubó la membrana con un anticuerpo primario dirigido contra Caspasa 8, Caspasa 9, Caspasa 3 y p53, a una dilución de 1:10,000 por toda la noche a -4°. Después del tiempo de incubación del anticuerpo primario se realizaron 3 lavados cada uno de quince minutos con TBS tween, luego se una solución con anticuerpo secundario durante 1 hora. Después de la incubación del anticuerpo secundario se lavó con TBS tween durante 40 minutos. Finalmente la membrana fue expuesta a una solución quimoluminiscente por 5 minutos, la luz emitida por la reacción entre la enzima reportera en el anticuerpo secundario y el sustrato es registrada en una película fotográfica.

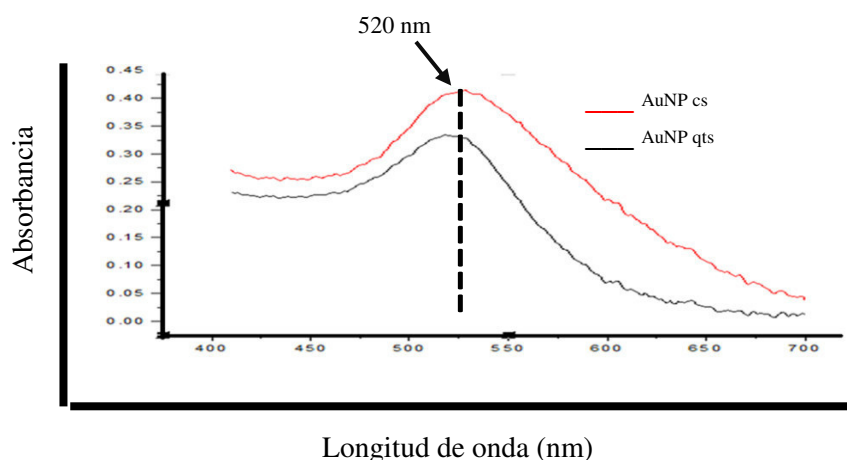
## **7.18      Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graphpad Prism 5. Todos los resultados presentan la media  $\pm$  DE en tres experimentos realizados de manera paralela a menos que se indique lo contrario. Se evaluaron las diferencias estadísticas usando la prueba t de Student y consideraron significativos los valores \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Caracterización de nanopartículas cubiertas con quitosano mediante el análisis del plasmón de resonancia, tamaño y potencial Z.

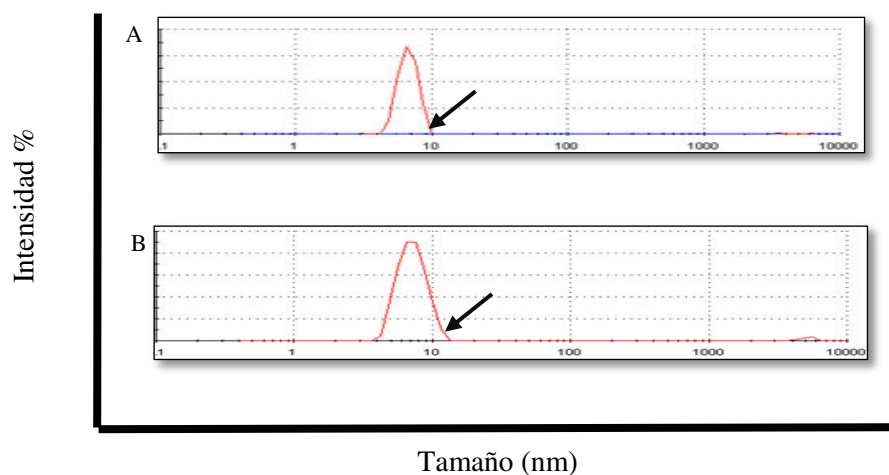
La síntesis de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano (AuNP qts) se realizó por el método químico (óxido – reducción). Para comparar el efecto de las AuNP qts con nanopartículas de oro ampliamente caracterizadas, se sintetizaron nanopartículas de oro utilizando citrato de sodio como agente reductor (AuNP Cs). Una vez realizadas las síntesis, se caracterizaron ambas AuNP's a través de espectroscopia ultra violeta visible (UV-vis). En ambas muestras se detecta una banda de máxima absorción a una longitud de onda de 520 nm, que indica el punto máximo de absorbancia, el cual corresponde al plasmón de resonancia de las nanopartículas de oro. Este resultado demuestra que efectivamente se obtuvieron AuNP's a partir de ambas síntesis (**Figura 20**).



**Figura 20. Análisis de plasmón de resonancia de AuNP.** Para ambas síntesis se encuentra una banda de máxima absorción a una longitud de onda de 520 nm, que corresponde al plasmón de resonancia del oro, esta característica sólo está presente cuando se encuentra en una estructura nanométrica.



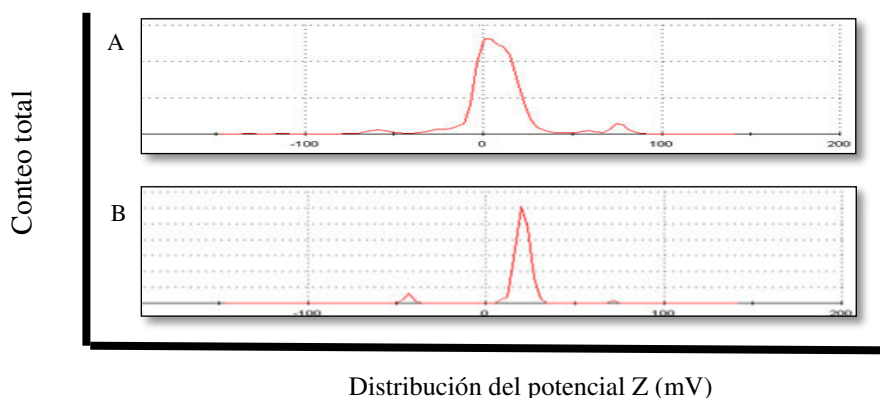
Una vez que se confirmó la obtención de nanopartículas de oro se prosiguió a realizar el análisis del tamaño en ambas síntesis de AuNP utilizando un analizador de la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Nanosizer), el cual se basa en la medición de los movimientos aleatorios de las partículas (movimiento browniano) y su velocidad, para determinar el tamaño. Nuestros resultados muestran que en ambas síntesis obtuvimos nanopartículas con un tamaño entre 1 -10 nanómetros con una polidispersidad menor a 0.3, lo cual indica la uniformidad en el tamaño de las nanopartículas obtenidas (**Figura 21**).



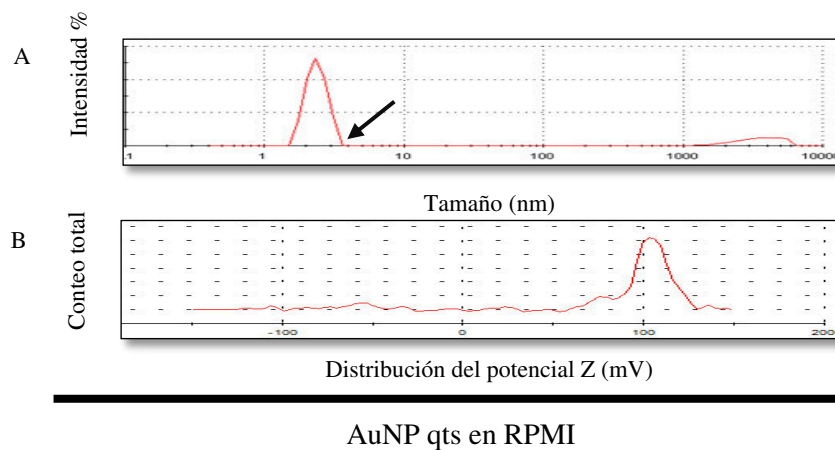
**Figura 21. Análisis de la distribución de tamaño de AuNP.** Se determinó el tamaño de las AuNP mediante la distribución dinámica de la luz con el uso de un Nanosizer. Se puede observar que en la síntesis de AuNP Cs (A) y AuNP qts (B) se obtuvieron nanopartículas entre 1 – 10 nm de tamaño.

Como parte de la caracterización se evaluó el potencial Z, una medida que nos permite analizar el comportamiento de las partículas en suspensión. Cuando tenemos un valor de potencial Z mayor a 0 o positivo, las partículas tienden a tener una mayor interacción con el medio, por lo que se necesita una mayor fuerza de repulsión para ser separadas, lo que las hace más solubles. Con un potencial Z negativo o menor a 0, éstas tienden a tener una menor interacción con el medio y una menor fuerza de repulsión, por lo que tienden a aglomerarse. Esta medición se realizó utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) en Nanosizer. Se obtuvo que AuNP Cs tienen un potencial Z de 0 +/- 5 mV y AuNP qts un potencial Z de 27 mV (**Figura 22**). Por lo que las AuNP qts poseen una mayor fuerza de repulsión al estar suspendidas en una solución. Posteriormente se analizó el potencial Z de AuNP qts diluidas en medio de cultivo

celular (RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino), esto con el fin de medir la fuerza de repulsión de las partículas en condiciones similares al entorno celular. Se observó que las AuNP qts diluidas en RPMI aumentan el valor de potencial Z a 100 mV, sin modificar el tamaño de la nanopartícula (**Figura 23**), lo que significa que tienen una menor tendencia a formar agregados, siendo más seguras y estables para futuros estudios en modelos biológicos.



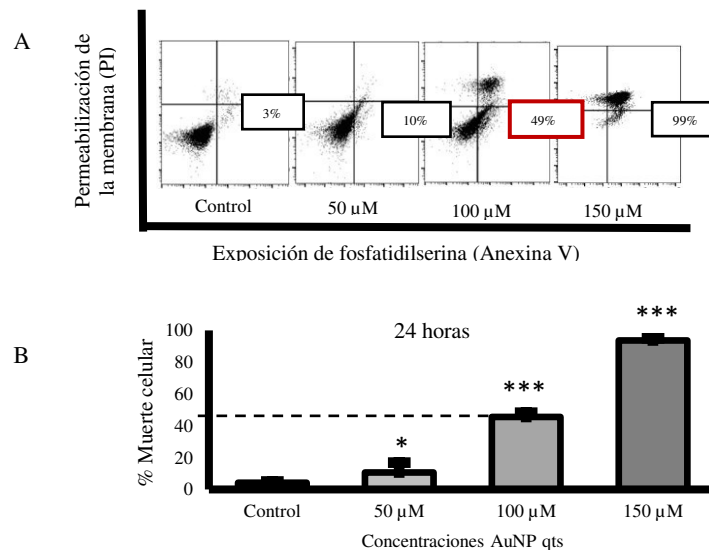
**Figura 22. Análisis de la distribución del potencial Z.** A) Las AuNP Cs tienen un potencial Z de 0 +/- 5 mV. B) las AuNP qts tienen un potencial Z de 27 mV.



**Figura 23. Análisis de tamaño y potencial Z de AuNP qts diluidas en medio de cultivo celular RPMI.** Se evaluó el tamaño (A) y potencial Z (B) de AuNP qts diluidas en RPMI por DLS en Nanosizer. A) AuNP qts diluidas en medio de cultivo celular RPMI 10% tienen un valor de potencial Z a 100 mV y un tamaño de la nanopartícula menor a 10 nm.

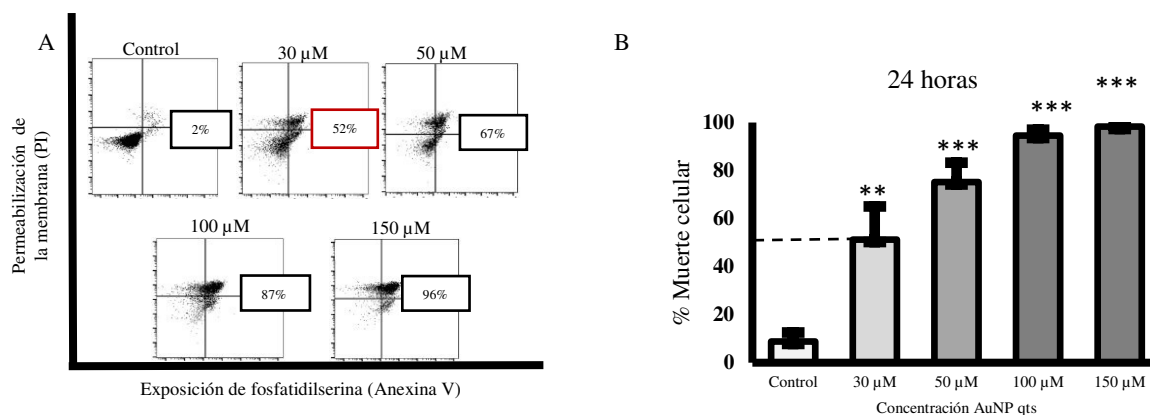
## 8.2 AuNP cubiertas con quitosano inducen exposición de fosfatidilserina y permeabilidad de la membrana plasmática en células K562 y Jurkat.

Una vez realizada la síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano (AuNP qts) se evaluó su efecto sobre la muerte celular en dos líneas de leucemia: k562 y Jurkat. El ensayo se realizó por citometría de flujo utilizando el marcaje anexina V (AnnV) para medir la exposición de la fosfatidilserina (señal cómemo) y Yoduro de propidio (PI), un agente intercalante del DNA que nos permite medir la permeabilidad de la membrana plasmática. Se utilizaron diferentes concentraciones de tratamiento (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) por un periodo de 24 horas. Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de AuNP qts encontramos un mayor porcentaje de células con doble marcaje de anexina y Yoduro de propidio (AnnV/PI +/+) (Figura 24 A). La concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) obtenida en células leucémicas de la línea k562 es de 100  $\mu$ M (Figura 24 B).



**Figura 24. Análisis de la muerte celular por citometría de flujo.** (A) Histograma de células k562 tratadas a diferentes concentraciones con AuNP qts expuestas durante 24 horas. Se puede observar como la población celular con marcaje doble negativo (AnnV/PI -/-) va migrando hasta el cuadrante con marcaje doble positivo (AnnV/PI +/+) con forme aumenta la concentración del tratamiento. Nuestros resultados muestran una IC<sub>50</sub> a 100  $\mu$ M. (B) Promedios obtenidos de tres experimentos independientes por triplicado. Diferencias estadísticas respecto al control no tratado. \* (p < 0,05), \*\*\* (p < 0,0001).

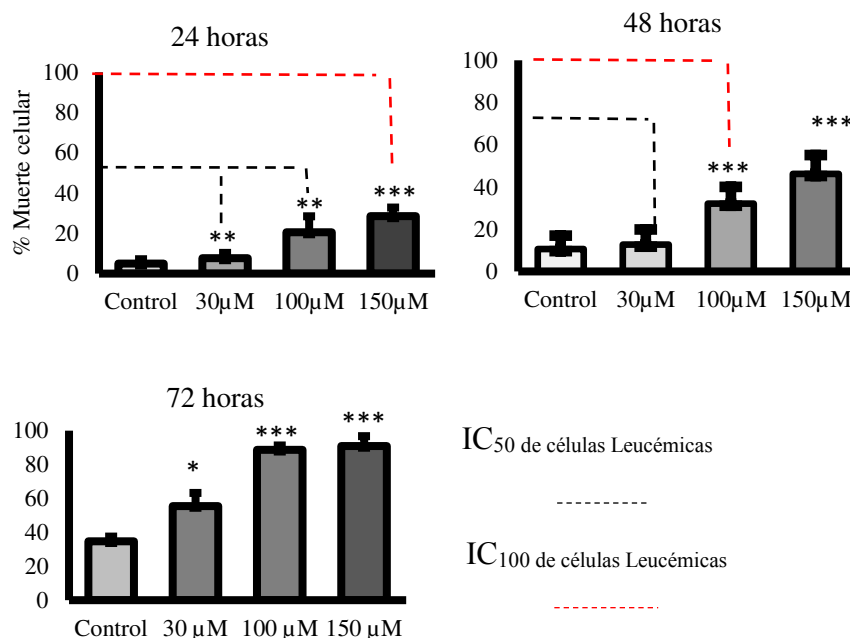
El mismo ensayo se realizó utilizando las células Jurkat, y se encontró que las AuNP qts inducen una muerte celular con un patrón similar a las k562 a una menor concentración, obteniendo una IC<sub>50</sub> a 30  $\mu$ M (**Figura 25**).



**Figura 25. Análisis de la muerte celular por citometría de flujo.** (A) Histograma de células Jurkat tratadas a diferentes concentraciones con AuNP qts expuestas durante 24 horas, se puede observar la IC<sub>50</sub> a 30  $\mu$ M. (B) Promedios obtenidos de tres experimentos independientes hechos por triplicado. \*\* (p < 0,001), \*\*\* (p < 0,0001).

### 8.3 AuNP cubiertas con quitosano tienen baja toxicidad en células sanas.

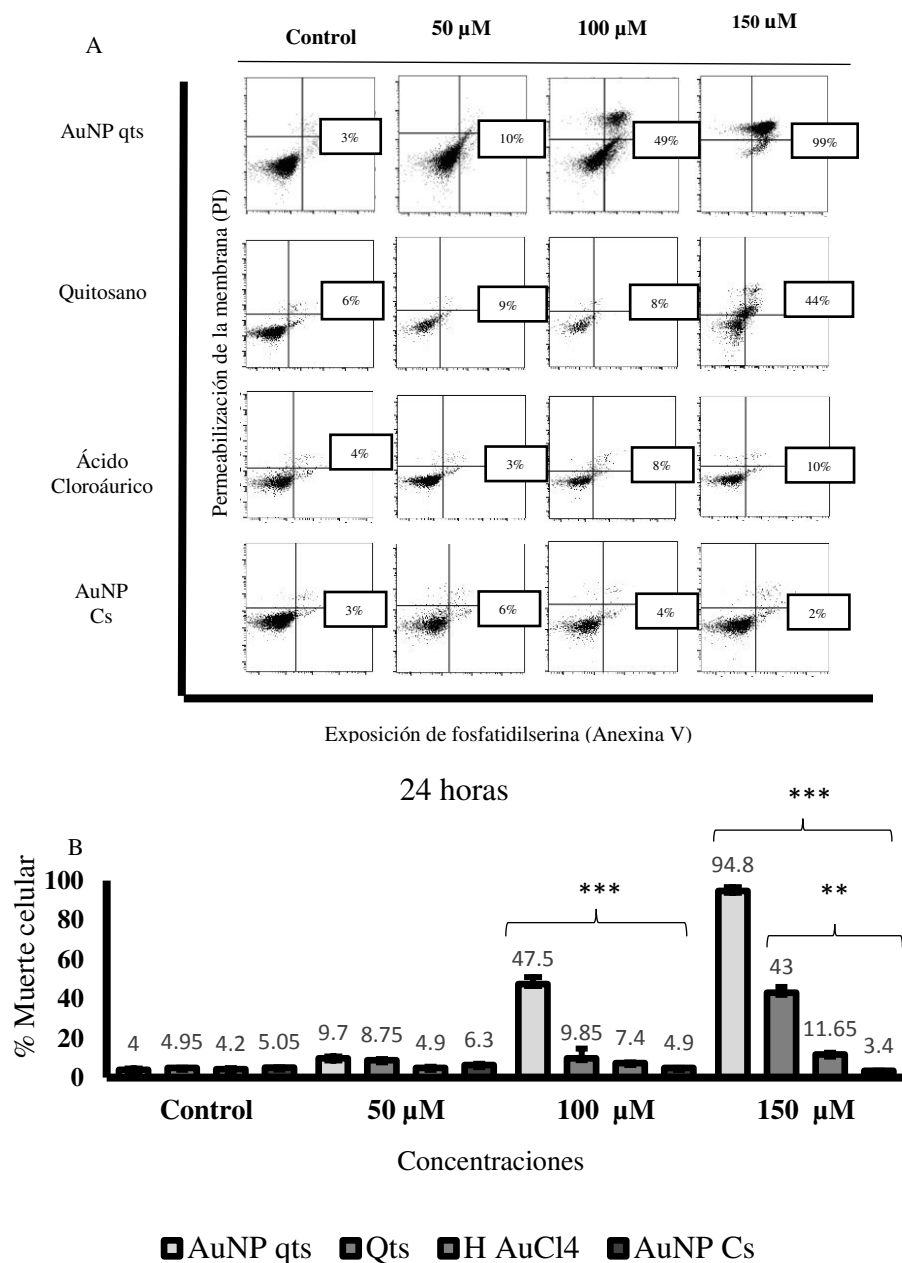
Una vez encontrada la IC<sub>50</sub> de las AuNP qts en las líneas de leucemia, se midió el efecto que estas tienen sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Las células fueron obtenidas a partir de la sangre de seis sujetos sanos. El análisis se realizó por citometría de flujo, utilizando el marcaje AnnV/PI. Se puede observar como las AuNP qts inducen una muy baja citotoxicidad en células sanas a las mismas concentraciones en las que se observa un 50% (línea negra) y 100% (línea roja) de muerte en células de leucemia a 24, 48 y 72 horas (**Figura 26**).



**Figura 26. Evaluación del efecto citotóxico de AuNP qts en células sanas.** Efecto citotóxico de AuNP qts sobre células mononucleares de sangre periférica. El análisis se realizó mediante citometría de flujo y se utilizó el marcaje AnnV/PI. Se observa como las AuNP qts inducen una menor citotoxicidad en células sanas a las mismas concentraciones que inducen una IC<sub>50</sub> (líneas negras) e IC<sub>100</sub> (línea roja) en k562 y Jurkat. Los promedios se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,001), \*\*\* (p < 0,0001).

#### 8.4 AuNP cubiertas con quitosano tienen un mayor efecto citotóxico que vehículos y AuNP de citrato de sodio en células leucémicas.

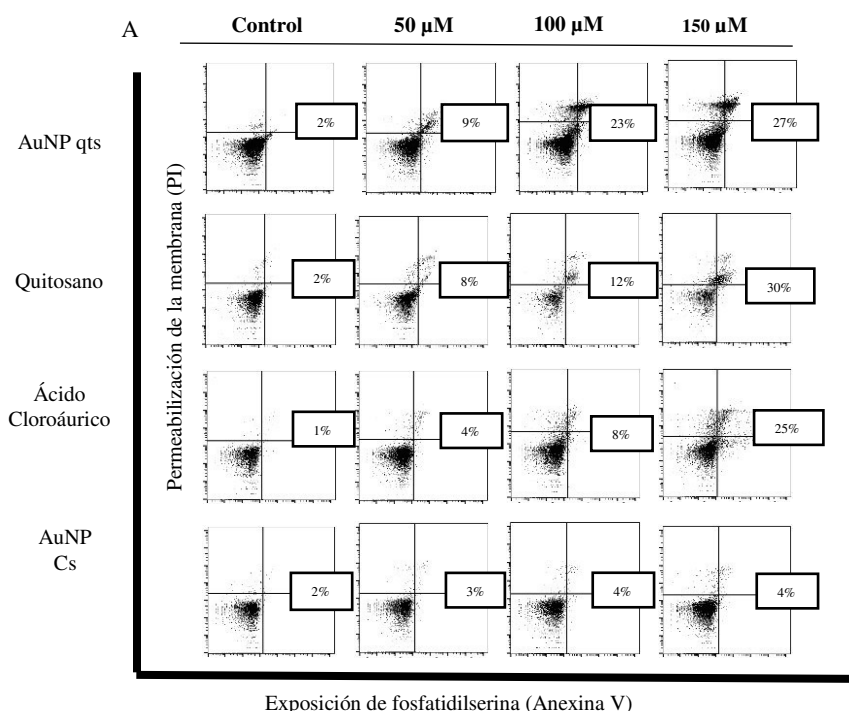
Después de evaluar la citotoxicidad de las AuNP qts, fue necesario determinar si dicho efecto sobre la muerte celular era producto de los vehículos empleados en la síntesis o AuNP qts. Para ello se realizó un análisis por citometría de flujo, utilizando marcaje AnnV/PI sobre la línea celular K562. Se midió el efecto del quitosano (Qts) y el ácido cloroáurico (H [AuCl<sub>4</sub>]), y como control se utilizaron AuNP Cs incubadas durante 24 horas a las mismas concentraciones (50 μM, 100 μM, 150 μM, 250 μM) de los ensayos anteriores. Los resultados muestran que a la IC<sub>50</sub> de las K562 tratadas con AuNP qts (100 μM), los demás tratamientos (quitosano, ácido cloroáurico y AuNPcs) tienen un menor porcentaje de muerte celular (**Figura 27**).



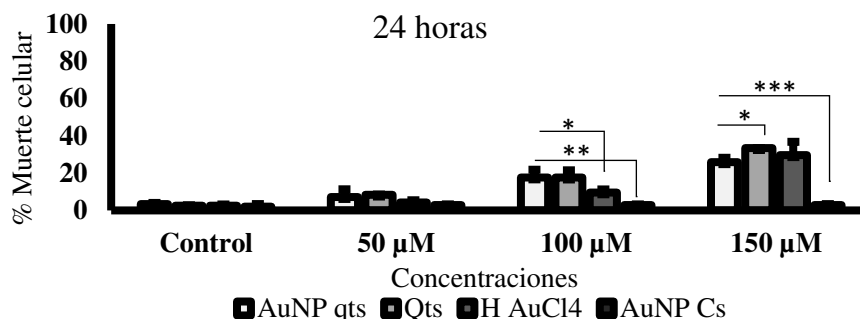
**Figura 27. Efecto citotóxico de vehículos y AuNP qts sobre células leucémicas.** Análisis del marcaje AnnV/PI mediante citometría de flujo en células K562. (A) Histogramas de células K562 tratadas con AuNP qts, quitosano, ácido cloroáurico [H (AuCl<sub>4</sub>)] y AuNPcs. Se observa cómo las AuNP qts tienen un mayor citotoxicidad en células k562 respecto al efecto de los vehículos y las AuNP Cs. (B) Gráfica de barras de los promedios de experimentos independientes realizados por triplicado. \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,001), \*\*\* (p < 0,0001).

### 8.5 Las AuNP cubiertas con quitosano, vehículos y AuNP de citrato de sodio tienen bajo efecto citotóxico en células sanas.

Ya que se obtuvo el efecto sobre las células de leucemia, se evaluó la citotoxicidad de las AuNP qts, vehículos (quitosano, ácido cloroáurico) y AuNP Cs sobre células PBMC. Esto fue realizado también por citometría de flujo, utilizando marcaje AnnV/PI. Se midió el efecto del tratamiento durante 24 horas a las mismas concentraciones (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 150  $\mu$ M) de los ensayos anteriores. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los tratamientos con AuNP qts, quitosano, ácido cloroáurico y AuNP Cs ( $p > 0,05$ ). Además se observó que los diferentes tratamientos poseen un bajo efecto citotóxico en PBMC a concentraciones inhibitorias medias de las células leucémicas k562 y Jurkat (**Figura 28**).



B

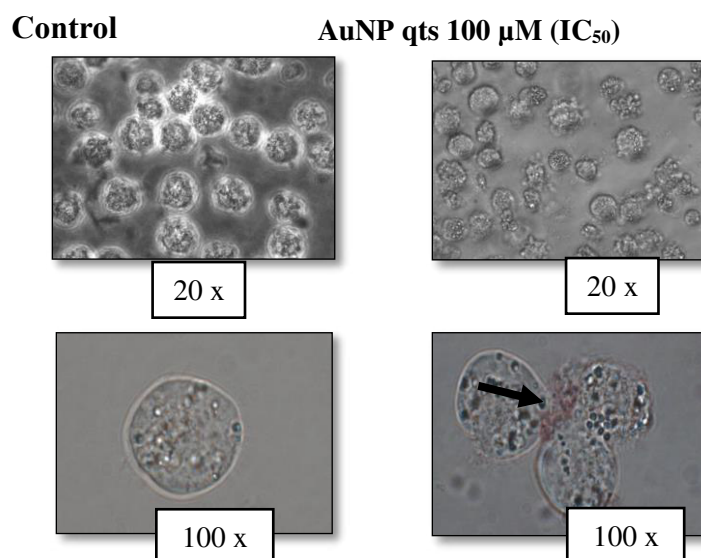


**Figura 28. Efecto citotóxico de vehículos y AuNP qts sobre células sanas.** A) Histogramas de PBMC tratadas con AuNP qts, quitosano, ácido cloroáurico [H (AuCl<sub>4</sub>)] y AuNP Cs. El análisis se realizó por citometría de flujo y se utilizó el marcaje AnnV/PI. B) Promedio de PBMC tratadas con los diferentes tratamientos. Los promedios se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados triplicado. \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,001), \*\*\* (p < 0,0001).

### 8.6 AuNP cubiertas con quitosano inducen cambios en la morfología de células leucémicas.

Una vez realizados los ensayos de citotoxicidad en células leucémicas y células mononucleares de sangre periférica. Se evaluó el efecto del tratamiento durante 24 horas con la IC<sub>50</sub> de AuNP qts sobre la morfología de la línea celular k562, con el uso de microscopio invertido. Se observó que las células tratadas con AuNP qts mostraban una serie de cambios en la morfología celular como un menor tamaño, presencia de protuberancias sobre la membrana plasmática, fragmentación y pérdida de la estructura celular en comparación de las células no tratadas (**Figura 29**).

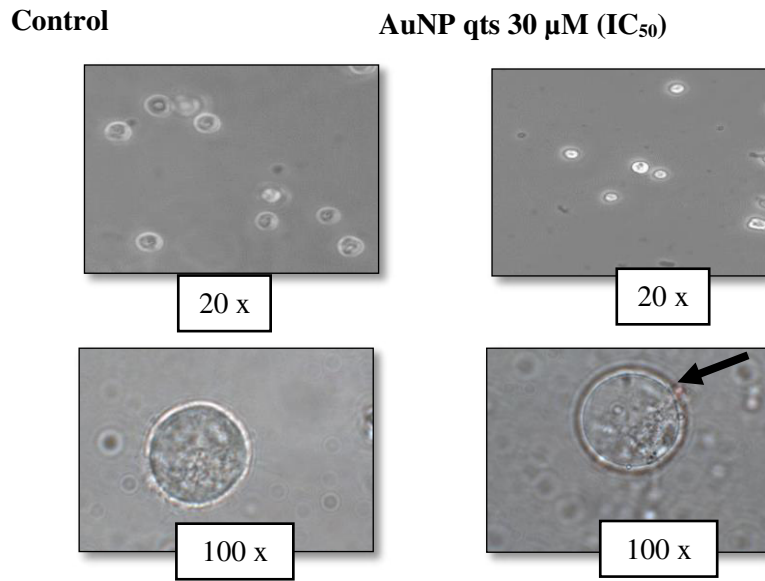




**Figura 29. Efecto de AuNP qts sobre la morfología de células leucémicas k562.** Imágenes tomadas con microscopio invertido con objetivos 20X, y 100X. Se puede observar como las células k562 tratadas con la  $IC_{50}$  de AuNP qts durante 24 horas manifiestan una serie de cambios en la morfología de la célula como lo son una disminución en el tamaño, formación de protuberancias sobre la membrana plasmática, fragmentación y pérdida de la estructura celular (flecha).

### **8.7 AuNP cubiertas con quitosano no inducen cambios en la morfología de células de sanas.**

De igual manera se evaluó el efecto que inducen AuNP qts, a la concentración correspondiente a la  $IC_{50}$  de células de leucemia linfocítica aguda (Jurkat), sobre la morfología celular de cultivos primarios de linfocitos obtenidos a partir de muestras de sangre de donadores sanos utilizando un microscopio invertido. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con AuNP qts ( $IC_{50}$ ) no induce cambios en tamaño, forma, ni estructura de los linfocitos sanos tratados durante 24 horas (**Figura 30**).

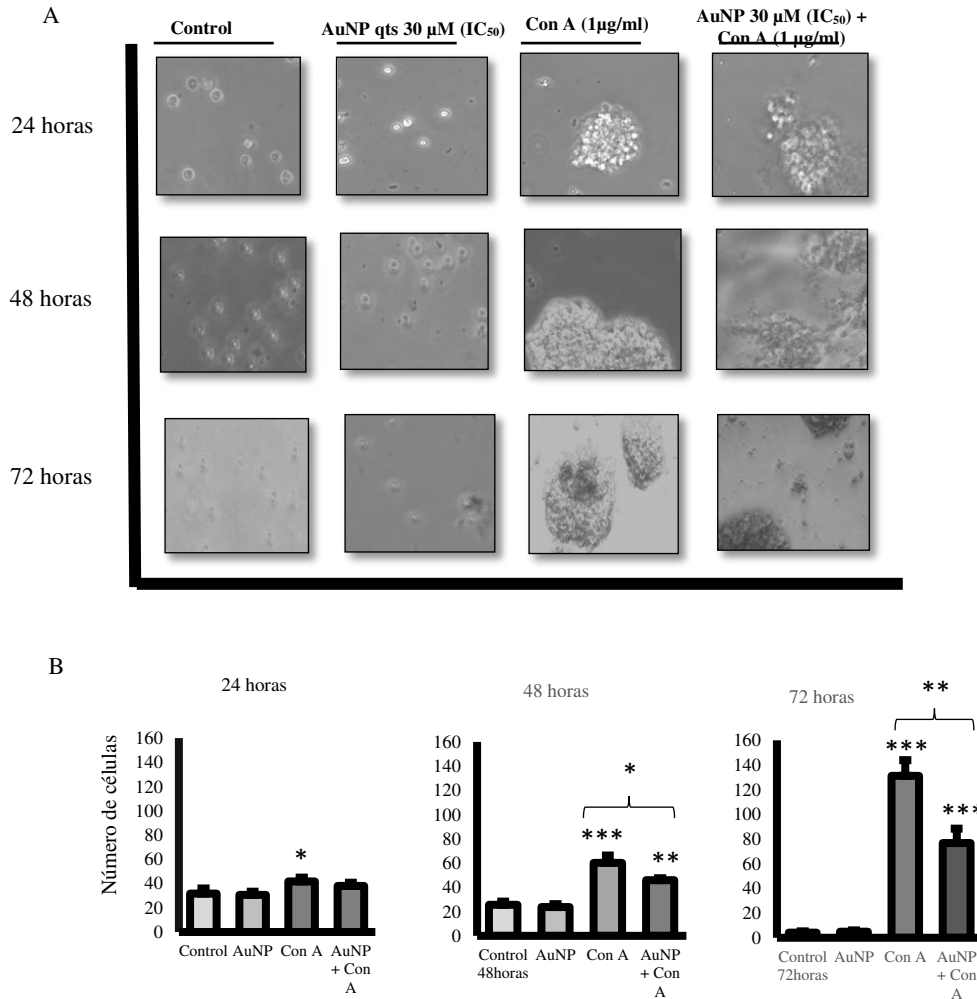


**Figura 30. Efecto de AuNP qts sobre la morfología de células sanas.** Imágenes tomadas con microscopio invertido usando objetivos 20X, y 100X. Se observa que el tratamiento de AuNP qts ( $IC_{50}$  de células Jurkat, leucemia linfóide aguda), durante 24 horas de exposición, no induce cambios sobre la morfología de linfocitos sanos (flecha).

### **8.8 AuNP cubiertas con quitosano inducen baja citotoxicidad en células linfoides no tumorales, estimulados con Concanavalina A.**

Uno de los principales inconvenientes de las terapias antitumorales es su efecto citotóxico no selectivo sobre células de rápido crecimiento como células sanas de piel, sistema gastrointestinal y sistema inmunológico. Por lo que se evaluó el efecto de AuNP qts sobre linfocitos estimulados con Concanavalina A, una lectina que actúa como mitógeno al ser reconocida por el receptor de linfocitos T como molécula no propia, estimulando la proliferación de las células. Los linfocitos fueron tratados con la  $IC_{50}$  de las Jurkat y Con A ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 24, 48 y 72 horas. Para obtener el número de células se utilizó la técnica de conteo por azul tripán. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Con A por 24 horas incrementa significativamente el número de células comparado con el control. A 48 horas se encontró que Con A + AuNP qts tienen un 30% menos de células comparadas con las tratadas sólo con el mitógeno. Este valor corresponde a la muerte celular observada a 48 horas en PBMC tratadas sin el mitógeno (**Figura 26**). También se observó que después de 72 horas las células linfoides tratadas

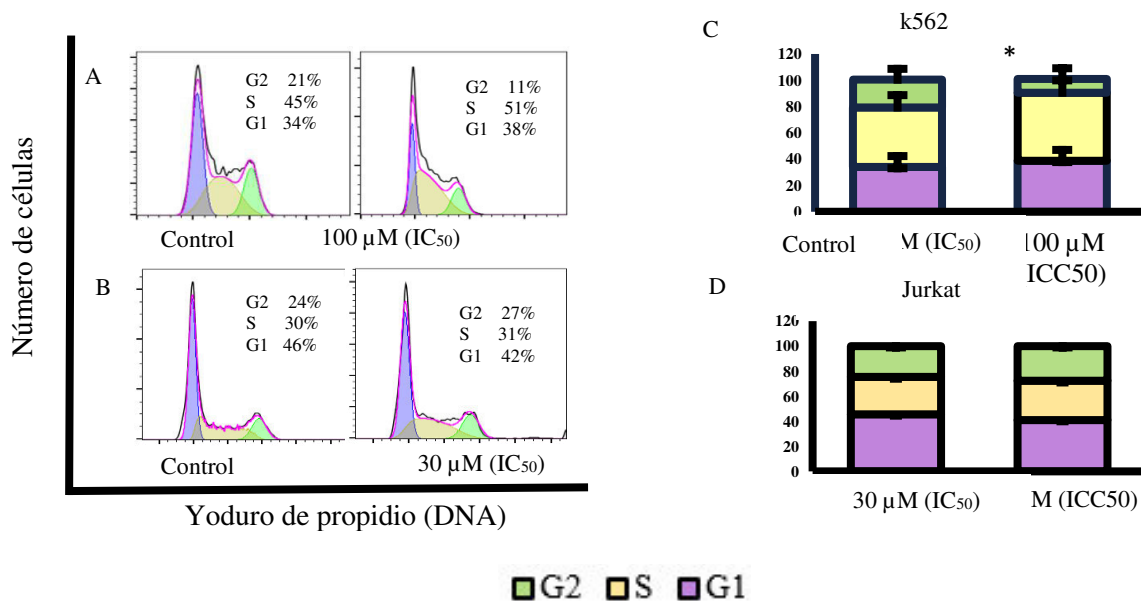
con AuNP qts + Con A tienen un 40% menos de células comparado con las células tratadas sólo con el mitógeno, sin embargo no se puede determinar si es debido a muerte o una disminución en la tasa de división celular, ya que se observa que las células continuaron su proliferación entre 48 y 72 horas. Estos resultados indican que las AuNP qts no inducen una mayor citotoxicidad en células sanas en un estado de rápida división (**Figura 31**).



**Figura 31** Análisis del efecto de AuNP qts sobre células linfoides estimuladas con Concanavalina A. Se evaluó el efecto de las AuNP qts sobre linfocitos estimulados con Concanavalina A (Con A) durante 24, 48 y 72 horas. El conteo celular se realizó por azul tripán. (A) Imágenes tomadas con microscopio invertido a un objetivo (20X) después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con el  $IC_{50}$  de AuNP qts en Jurkat. (B) Porcentaje de células tratadas bajo los distintos tipos de tratamiento por 24, 48, 72 en tres experimentos independientes por triplicado. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### 8.9 AuNP cubiertas con quitosano no inducen arresto en el ciclo celular en células k562 y Jurkat.

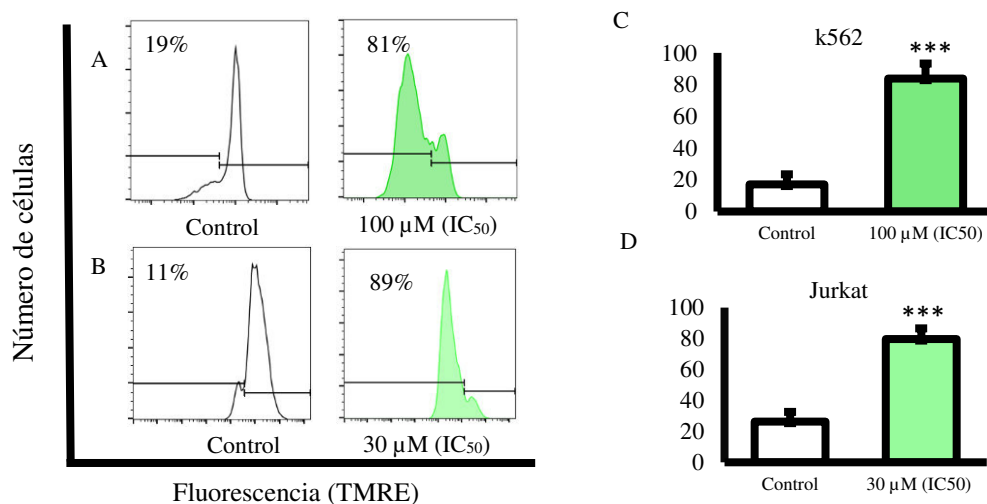
Después de obtener la IC<sub>50</sub> en ambas líneas celulares de leucemia se estudió el efecto de las AuNP qts sobre el ciclo celular. Esto se realizó por citometría de flujo utilizando un marcaje con Yoduro de Propidio (ver sección Materiales y Métodos). Los resultados fueron analizados con el Software Flowjo y se observó que las células k562 no presentan diferencias significativas entre células tratadas durante 24 horas con AuNP qts y no tratadas en la fase G1 y S del ciclo celular. Sin embargo, se obtuvo que en fase G2 el número de células fue 10% menor en comparación con el control ( $p < 0,05$ ). En el caso de las Jurkat tratadas con AuNP qts durante 24 horas no se observan cambios significativos en ninguna de las fases del ciclo celular, esto indica que las AuNP qts no inducen cambios significativos en el ciclo celular de células leucémicas (**Figura 32**).



**Figura 32. Análisis del efecto de AuNP qts sobre ciclo celular.** Se evaluó el efecto de las AuNP qts sobre el ciclo celular utilizando un marcaje de Yoduro de propidio (PI) por citometría de flujo. Se puede observar en morado la fase G0/G1, en amarillo la fase S y en verde la fase G2/M. (A) Histograma de células k562 tratadas con AuNP IC<sub>50</sub>. (B) Histograma de células Jurkat tratadas con AuNP IC<sub>50</sub>. (C) Promedio de células k562 tratadas con AuNP qts durante 24 horas (D) Porcentaje de células Jurkat tratadas con AuNP qts por 24 horas. Los promedios se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \* $p < 0,05$

### 8.10 AuNP cubiertas con quitosano inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células leucémicas.

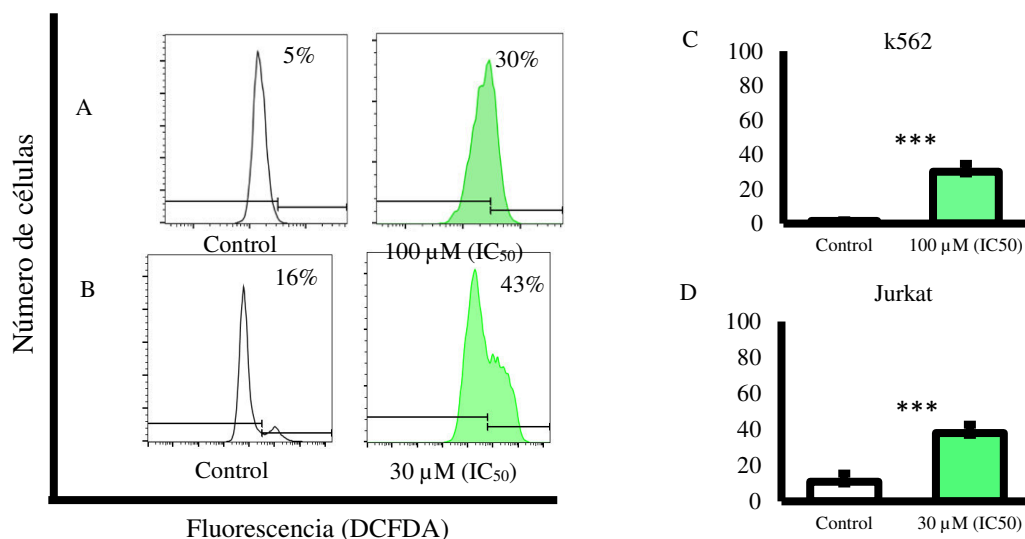
Con el fin de comprender el mecanismo citotóxico de las AuNP qts en células leucémicas se evaluó el efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). El análisis se realizó por citometría de flujo utilizando un marcador de actividad mitocondrial TMRE (Etil éster tetrametilrodamina), el cual es secuestrado por mitocondrias que mantienen su potencial de membrana íntegro. El grado de pérdida del potencial de membrana mitocondrial es analizado con software Flowjo. Podemos observar que después de 24 horas las AuNP qts IC<sub>50</sub> inducen un 81% de pérdida del potencial de membrana mitocondrial en células k562 y un 89% en Jurkat (**Figura 33**). Este resultado muestra que las mitocondrias pierden su potencial de membrana antes de iniciar el proceso de muerte celular ya que a una IC<sub>50</sub> obtenemos casi un total daño mitocondrial, indicando que el daño mitocondrial es un paso previo a la muerte.



**Figura 33. Análisis del efecto de las AuNP qts sobre el potencial de membrana mitocondrial en células leucémicas.** El análisis se realizó por citometría de flujo y se utilizó marcaje TMRE para medir la actividad mitocondrial. (A) Histograma de k562 tratadas con AuNP qts IC<sub>50</sub> durante 24 horas. Se puede observar como la población celular se desplaza hacia la izquierda (TMRE positivo) una vez que la mitocondria es incapaz de mantener el marcaje. (B) Histograma de células Jurkat. (C, D) Porcentaje de células con pérdida del potencial de membrana mitocondrial tratadas con AuNP IC<sub>50</sub>. Los promedios se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado ( $p < 0,0001$ ).

### 8.11 AuNP cubiertas con quitosano inducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células leucémicas.

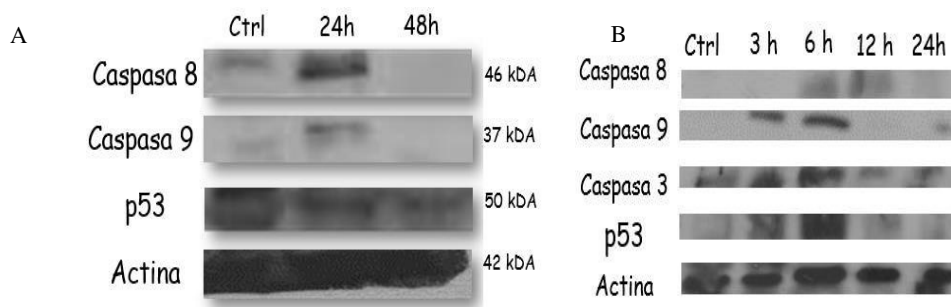
Una vez que se determinó que las AuNP qts inducen pérdida del potencial de membrana mitocondrial utilizando la IC<sub>50</sub> en células leucémicas k562 y Jurkat se evaluó el efecto que tienen las AuNP qts sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto se realizó por citometría de flujo y se utilizó un marcaje DCFDA (dichlorofluorescein diacetate), un reactivo que penetra en la célula y en presencia de ROS es convertido en DCF (dichlorofluorescein), un compuesto altamente fluorescente. Podemos observar que el tratamiento con AuNP qts IC<sub>50</sub> induce desplazamiento en la población celular hacia la derecha con respecto al control. Este aumento en la intensidad de fluorescencia corresponde a la oxidación de la Diclorofluoresceína (DCF), lo cual indica un aumento en la producción de ROS. Los resultados muestran que AuNP qts inducen estrés oxidativo en las células k562 y Jurkat ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 34**).



**Figura 34. Efecto de las AuNP cubiertas con quitosano sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS).** Se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno utilizando el fluorocromo DCFDA (Diclorofluoresceína diacetato). El análisis fue llevado a cabo por citometría de flujo y se analizó con el software Flowjo. **(A)** Histograma de células k562 tratadas con AuNP qts IC<sub>50</sub> durante 24 horas. Se puede observar un desplazamiento a la derecha con respecto a la población celular control. **(B)** Histograma de células Jurkat. **(C)** Porcentaje de células k562 positivas a la producción de ROS. **(D)** Porcentaje de células Jurkat positivas a la producción de ROS. Los promedios se obtuvieron de tres experimentos independientes realizados por triplicado (\*\*\*)  $p > 0,0001$ .

### 8.11 AuNP cubiertas con quitosano aumentan la expresión de caspasa activa 8 y 9 en células leucémicas.

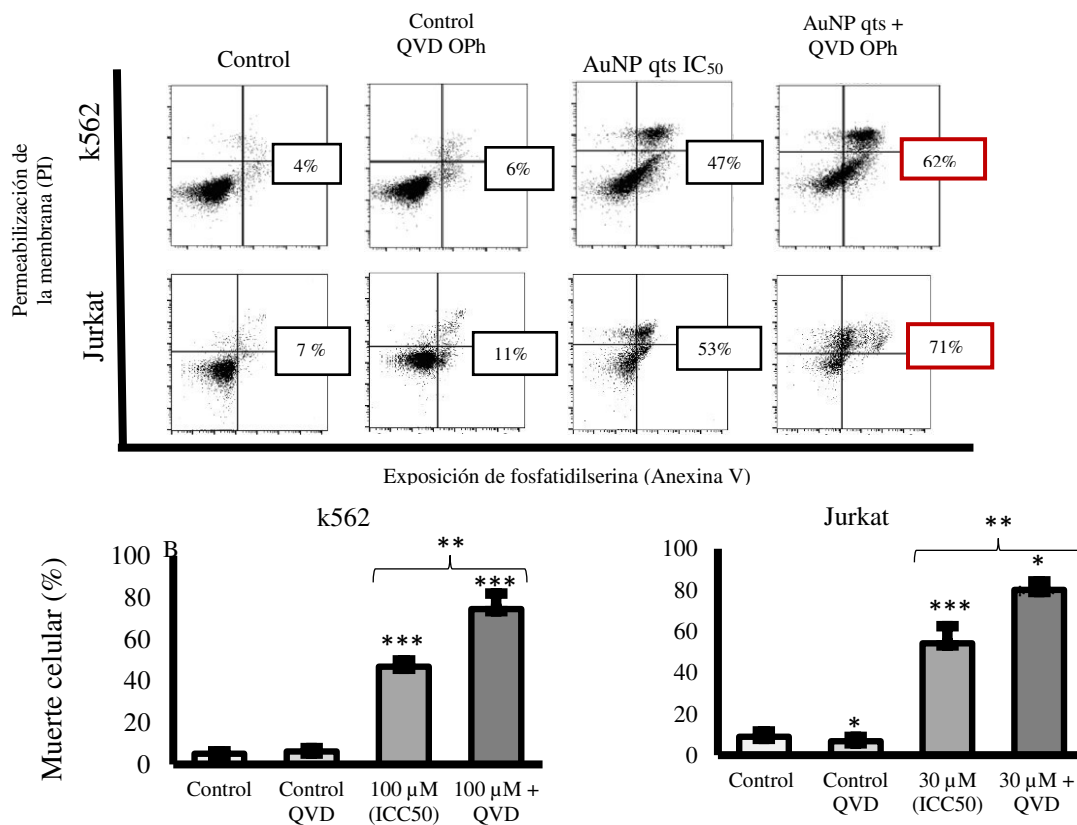
Una vez que se determinó que las AuNP qts inducen un daño mitocondrial y la consecuente producción de ROS. Se evaluó mediante Western blot la expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular regulada mediada por apoptosis. Para ello se utilizaron anticuerpos contra Caspasa 8 activa, Caspasa 9 activa, Caspasa 3 activa, p53 y  $\beta$ -actina como control de carga. Nuestros resultados mostraron que células Jurkat tratadas con AuNP qts  $IC_{50}$  durante 24 horas muestran una mayor expresión de Caspasa 8 activa, y también un ligero incremento en la expresión de caspasa 9 activa, con respecto al control (**Figura 35**). Sin embargo, no se observa un cambio en la expresión de p53 después del tratamiento con AuNP qts. Mientras que en las k562 se observa sólo la expresión de caspasa 8 activa a las 6 y 12 horas, también una marcada expresión de caspasa 9 a las 3 y 12 horas. También se observa muy poca diferencia en la expresión de caspasa 3 respecto al control y una expresión de p53 después de 3 y 6 horas de tratamiento con AuNP qts (**Figura 35**).



**Figura 35. Análisis de la expresión de caspasa 8 activa, caspasa 9 activa, caspasa 3 activa, p53, y  $\beta$ -actina.** (A) Células Jurkat tratadas durante 24 y 48 horas con AuNP  $IC_{50}$ . Se observa que en Jurkat existe una mayor expresión de caspasa 8 activa y caspasa 9 activa a las 24 horas. (B) Células k562 dejadas sin tratamiento y tratadas durante 12 y 24 horas con AuNP  $IC_{50}$ . (B) En las k562 se detecta una expresión de caspasa 8 activa a las 6 y 12 horas de tratamiento con AuNP  $IC_{50}$ . Se puede ver también la expresión a las 3 y 6 horas de la caspasa 9 activa. Muy poco aumento de la activación de la caspasa 3. Y la expresión de p53 a las 6 horas de tratar las k562 con AuNP.

### 8.12 AuNP cubiertas con quitosano inducen muerte celular independiente de caspasas.

Se ha demostrado que la expresión de caspasa 8 activa no indica necesariamente que el mecanismo de muerte celular sea dependiente de caspasas (M. Liu et al., 2013). Debido a esto se evaluó la dependencia de caspasas utilizando un inhibidor de caspasas QVD-OPh, el cual es un potente inhibidor de caspasa 8 (Caserta et al., 2003). Posteriormente se analizó la muerte celular inducida por las AuNP qts por citometría de flujo utilizando el marcaje Anexina V/Pi. Los resultados mostraron que las células tratadas con AuNP qts IC<sub>50</sub> + QVD-OPh presentan casi un 25 % más de muerte celular que los controles y AuNP qts IC<sub>50</sub> en k562 ( $p < 0,001$ ). Y un 20% en Jurkat ( $p < 0,05$ ). Esto indica que la muerte celular inducida por las AuNP qts es independiente de caspasas en la línea k562 y Jurkat (**Figura 36**).



**Figura 36. Análisis de la inhibición de caspasas en células leucémicas tratadas con AuNP qts.** (A) Histograma de células k562 y células Jurkat tratadas con AuNP qts y QVD oPH durante 24 horas (B) Gráfica de barras del promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado en células k562 y Jurkat tratadas con AuNP qts utilizando un inhibidor de Caspasas QVD-OPh. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\* ( $p < 0,0001$ ).



## IX. DISCUSIÓN

La leucemia es un tipo de cáncer que afecta a las células derivadas de la médula ósea que representa un serio problema de salud pública debido a su alto porcentaje de morbilidad y mortalidad. Recientemente se ha observado un mayor número de resistencia y reincidencia a los tratamientos convencionales (Schmidt et al., 2004), los cuales consisten en el uso combinado de terapias inespecíficas, costosas y riesgosas. Se sabe que dichas resistencias y reincidencias están mediadas por distintos factores asociados a características propias de las células cancerosas, siendo una de las más importantes: la evasión o resistencia a la muerte celular (Labi & Erlacher, 2015; Weiyang et al., 2014). En estudios recientes se ha evaluado el rol de la nanotecnología en el desarrollo de terapias contra el cáncer debido a las propiedades de algunos materiales como lo son las nanopartículas de oro (AuNP), las cuales han demostrado tener una gran cantidad de funciones biológicas, entre las que se encuentra su capacidad de inducir muerte celular (Selim & Hendi, 2012). Dicho efecto se ha observado que depende de características físico-químicas de la nanopartícula de oro (Lewinski, Colvin, & Drezek, 2008), como concentración, tiempo, tamaño, y forma, los cuales son determinados por distintos factores como el tipo de agente reductor empleado durante la síntesis (Hauck, Ghazani, & Chan, 2008). En este estudio se utilizó el quitosano como agente reductor debido a que se ha reportado que posee un fuerte efecto antitumoral al inducir muerte celular de manera regulada en algunas líneas celulares de leucemia como U937, K562, HL60 de forma soluble (M. O. Kim et al., 2013) y líneas celulares de cáncer de mama y pulmón, como MCF-7, A549 en forma de nanopartícula (Choi et al., 2012).

El primer objetivo de este proyecto fue la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro cubiertas de quitosano de 10 nm (AuNP qts). Para cumplir este objetivo se sintetizaron AuNP mediante el método químico de óxido-reducción o método de Turkevich, el cual es un tipo de síntesis práctica, fácil, y barata (Kimling et al., 2006). Para realizar la síntesis se requiere del uso de un agente precursor como el ácido cloroáurico [ $\text{H}(\text{AuCl}_4)$ ], un agente reductor como: citratos, boratos, y un agente

protector como pueden ser algunos tipos de alcoholes (Corzo Lucioni, 2012). Nosotros utilizamos el quitosano, un polisacárido de carácter catiónico, como agente reductor debido a que existen diversas investigaciones que sugieren que los agente reductores catiónicos poseen al menos 27 veces mayor toxicidad en células de cáncer que los reductores de tipo aniónicos (Lin, Zhang, Chen, & Zheng, 2010).

Una vez realizada la síntesis se caracterizaron ambas AuNP's a través de espectroscopia ultra violeta visible (UV-vis) una técnica que nos permite evaluar la composición y estructura de las partículas mediante el uso de emisión de fotones. Nuestros resultados muestran que ambas AuNPs presentan una banda de máxima absorbancia a 520 nm de longitud de onda, la cual corresponde con el plasmón de resonancia del oro (X. Huang & El-Sayed, 2010), una propiedad de algunos materiales metálicos que sólo se encuentra en un estado sólido nanométrico. Esta banda a 520 nm de longitud de onda se encuentra constante en nanoestructuras de forma esférica menores a 50 nm en las que se utiliza ácido cloroáurico como agente reductor (AlanáCreighton, 1991; Jain et al., 2012).

Uno de los puntos más discutidos referente al uso de AuNP es el tamaño, ya que es un parámetro de suma importancia que repercute directamente en las funciones biológicas de las AuNP (Abadeer & Murphy, 2016). En algunos estudios se ha observado que AuNP menores a 25 nm inducen un mayor porcentaje de citotoxicidad comparado con AuNP de mayor tamaño (Selim & Hendi, 2012). En este proyecto de tesis las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano utilizadas fueron sintetizadas en un rango de tamaño entre 1-10 nm debido a un estudio realizado anteriormente donde se evaluó el efecto de las AuNP cubiertas con quitosano a diferentes tamaños bajo las mismas condiciones de síntesis y mismas proporciones de ácido cloroáurico y quitosano utilizadas en nuestros ensayos, donde se observó que las AuNP cubiertas con quitosano con tamaños menores a 10 nm tienen un mayor efecto citotóxico concentración y tiempo dependientes que AuNP cubiertas con quitosano de tamaño entre 50 – 100 nm (De León- Chávez., 2016). Para medir las AuNP se utilizó un analizador de la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Nanosizer) el cual mide la dispersión dinámica de luz (DLS) producida por el movimiento browniano de las AuNP. Como control se sintetizaron nanopartículas de oro utilizando citrato de sodio como agente reductor. Nuestros resultados muestran que en ambas síntesis (citrato de sodio y quitosano),

obtuvimos nanopartículas con un tamaño entre 1 -10 nanómetros con una polidispersidad menor a 0.3, lo que indica que nuestro grado de variación con respecto al tamaño promedio es menor al 0.3 por ciento.

Posteriormente se midió el potencial Z en ambas AuNP a través de DLS en Nanosizer. Esta medida es de suma importancia ya que con ella podemos determinar la fuerza de repulsión entre las AuNP, lo que indica su capacidad de dispersión o aglomeración en una solución (O'Brien, Midmore, Lamb, & Hunter, 1990). Nuestros resultados mostraron que las AuNP citrato de sodio tienen un potencial Z de alrededor de 5 mV. En otros estudios donde se han utilizado AuNP Cs se ha observado que el potencial Z varía y que no depende del tamaño de las AuNP ni del valor del pH, ya que en un estudio se sintetizaron AuNP Cs desde 3, 5, 6, 8, 17, 22, 30, y 45 nm de tamaño cada una evaluada en distintos pH de 4 a 9, observando que en todos los casos el potencial Z de AuNP Cs era de -30 +/-5 mV (Vijayakumar, 2014). Sin embargo se observó en otro estudio AuNP Cs de 18 nm con un potencial Z de -20 mV (Verma et al., 2014), AuNP Cs de 10 nm con un potencial de Z de -30 mV (Mohan, Praveen, Chennazhi, Jayakumar, & Nair, 2013), y AuNP Cs de 20 nm con un potencial Z de -45 mV (Arvizo et al., 2013). Otros autores observaron que el potencial Z de AuNP depende del tiempo, tamaño y pH ya que midieron el potencial Z de AuNP Cs a diferentes horas 0, 1, 2, 3, 24, 72, 169 a un tamaño de 5.6 nm obteniendo valores desde -27.5 mV a las 0 horas, -16 mV a la primera hora y de ahí en aumento hasta -39.9 mV a las 169 horas. También observaron que a pH de 4 las medidas van de -40 mV a las 0 horas, a -13.9 mV a las 169 horas, comparado con agua mili Q y con biobuffer donde los valores a través del tiempo fueron de -9.54 mV hasta -10.6 mV en tamaños entre 5 y 10 nm (A. Wang et al., 2014). En el caso de las AuNP cubiertas con quitosano (AuNP qts) obtuvimos un potencial Z de 27 mV con quitosano 0.5%. En otros estudios se midió el potencial Z de AuNP qts de 10 nm de tamaño y se encontró que dependiendo de la concentración de quitosano esta puede variar de 23 mV usando quitosano al 0.001% a 65 mV al 0.1% de quitosano a un pH de 5 (Boyles et al., 2015). En otro estudio se utilizaron AuNP qts de 40 nm donde se encontró un potencial Z de 41.5 mV con quitosano 0.49% (Choi et al., 2012). En algunos estudios se considera que la medida del potencial Z debe tener valores mayores a +/- 30 mV para ser consideraras como estables en una solución (Greenwood, 2003;

Vijayakumar, 2014), mientras que otros consideran que los valores pueden ser menores y que no se afecta la estabilidad de las AuNP (Jáuregui-haza, 2012). Sin embargo es muy importante que las AuNP no formen aglomerados en modelos biológicos, por lo que se midió el potencial Z de AuNP qts al ser suspendidas en medio de cultivo celular. Nuestros resultados muestran que las AuNP qts suspendidas en medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium) complementado con 10% de suero fetal bovino aumentan su valor de potencial Z hasta 100 mV sin modificar el tamaño de las AuNP (1-10 nm), este aumento en el potencial Z es importante ya que nos indica que nuestras AuNP qts son estables y seguras para ser utilizadas en un modelo biológico. En otro estudio se evaluaron AuNP cubiertas con ácido carboxílico y un agente hidrocarbonado de 10, 25, 50 y 100 nm suspendidas en medio de cultivo celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) sin complementar y complementado con suero fetal bovino 10% comparado con AuNP suspendidas en agua desionizada y se observó que las AuNP suspendidas en agua desionizada tienen un potencial Z de -71 mV sin cambiar el tamaño de las AuNP, las que fueron suspendidas en DMEM sin complementar mostraron un potencial de -22 mV sin afectar tamaño y sin mostrar aglomeración de proteínas, en cambio las que estuvieron en DMEM 10 % tienen a formar complejos de mayor tamaño alrededor de diez veces más grandes que los tamaños iniciales, además tienen a formar un aglomerado de proteínas alrededor de las nanopartículas (corona de proteínas), el cual se relaciona con una mayor captación por parte de las células tratadas, así como también se observó un aumento en el valor del potencial Z hasta -15 mV (Sabuncu et al., 2012). Por otro lado se sintetizaron AuNP de poliestireno 63, 71, 297 y 332 nm con diferentes modificaciones en los grupos amino del agente reductor, las cuales fueron diluidas en medio de cultivo DMEM. Se observó que las AuNP tendieron a formar complejos de mayor tamaño aproximadamente cuatro veces sus tamaños iniciales, así como también se obtuvieron valores disminuidos de potencial Z lo que indica que el potencial Z depende de las características químicas del agente reductor (Xia, Kovochich, Liong, Zink, & Nel, 2008). Por otro lado se evaluaron AuNP sintetizadas con diferentes agentes reductores, AuNP Cs y AuNP sintetizadas con PAMAM entre 10 y 12 nm, en las cuales se comparó el potencial Z una vez fueron diluidas en medio de cultivo 10%. Se observó que AuNP Cs diluidas en medio

complementado aumentan sus valores de potencial Z de -15 a -1 y en el caso de las AuNP PAMAM el valor del potencial Z se ve disminuido, pasando de 41 mV a -6.8 mV. En ambas síntesis se observó que no hubo variaciones en el tamaño (Paino et al., 2012). Además se realizó un estudio donde se comparó el efecto de las AuNP diluidas en dos medios de cultivo celular; DMEM y RPMI. Los resultados mostraron que las AuNP diluidas en RPMI no tendían a formar aglomerados de mayor tamaño, poseen una mayor capacidad de internalizarse en células Hela y UP930, así como también una menor proporción de una capa de proteínas que rodean las superficie conocida como corona de proteína (*Protein coronas*) la cual está relacionada con un mayor efecto citotóxico tiempo dependiente (Boyles et al., 2015; Lundqvist et al., 2008; Maiorano et al., 2010). Se ha reportado que la presencia y grosor de la corona de proteínas es uno de los principales factores que regulan la citotoxicidad a través de la regulación de los mecanismos de endocitosis, y que a su vez pueden determinar el tipo de muerte celular (Xia et al., 2008b). Se ha visto que el tipo de corona de proteínas está determinado por pH y concentración de solutos en una solución, por lo que es necesario evaluar el comportamiento de AuNP qts en suero o plasma para su posterior aplicación en modelos *in vivo* (Boyles et al., 2015).

Una vez realizada la síntesis y caracterización de las nanopartículas de oro cubiertas con quitosano (AuNP qts) se evaluó el efecto citotóxico que producen las AuNP sobre las líneas celulares leucémicas k562 y Jurkat. El ensayo se realizó por citometría de flujo utilizando el marcaje anexina V y Yoduro de propidio (PI). Los resultados mostraron que células tratadas con AuNP qts durante 24 horas muestran permeabilidad de la membrana y exposición de fosfatidilserina, encontrando un 50% de muerte celular a una concentración de 100  $\mu$ M, y un 100% de muerte celular a 150  $\mu$ M en la línea k562. En las células Jurkat se encontró que AuNP qts inducen muerte celular a una menor concentración que las k562, obteniendo un 50% de muerte a una concentración de 30  $\mu$ M y un 100% a 100  $\mu$ M. En otros estudios se ha observado que el uso de AuNP qts induce permeabilidad de la membrana plasmática y exposición de fosfatidilserina a diferentes tiempos y concentraciones en algunas líneas celulares de cáncer. En líneas A549, NCI-H460, A431 se encontró que AuNP qts con un tamaño de 15 nm inducen una concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) a 29  $\mu$ g/ml en células tratadas durante 24 horas

(Choi et al., 2012). En células Hela se observó una  $IC_{50}$  con AuNP qts menores a 10 nm a 75  $\mu$ M (De León-Chávez., 2016), al igual en MCF7 (Rodríguez-Abrego), y HT29 (Álvarez-Chairez, 2016). Por otro lado se ha reportado que la sensibilidad de las líneas celulares también depende del agente reductor empleado ya que AuNP sintetizadas con ácido carboxílico de 10, 25, 50 y 100 nm no inducen citotoxicidad en células Jurkat a 24 y 48 horas, observando un efecto citotóxico muy bajo después de 72 horas de tratamiento (Sabuncu et al., 2012). En otro estudio se utilizaron AuNP CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) con un tamaño de 18 nm en células k562 y se observó que estas no inducen citotoxicidad después de 24 y 48 horas de tratamiento (Connor et al., 2005). Por lo que observamos que el efecto citotóxico de las AuNP depende de la línea celular, tiempo y el agente reductor empleado para la síntesis.

Una vez encontrada la  $IC_{50}$  de las AuNP qts en las líneas de k562 y Jurkat, se midió el efecto que tienen sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) debido a que la leucemia es un tipo de cáncer que afecta a las células de la sangre y los tratamientos convencionales son inespecíficos, por lo que es necesario comparar el efecto de las AuNP qts sobre las células sanas. Nuestros resultados muestran que las AuNP qts inducen una muy baja citotoxicidad en células sanas ya que a las mismas concentraciones en las que obtuvimos un 50% de muerte en Jurkat (30  $\mu$ M) y k562 (100 $\mu$ m) se induce un 5% y 11% de muerte en PBMC, de igual manera en concentraciones donde tenemos un 100% de muerte en células de leucemia se observa sólo un 28% en células sanas después de 24 horas de tratamiento. En otros estudios se utilizaron AuNP Cs y AuNP PAMAM a una concentración de 50  $\mu$ M y observaron que ambas AuNP inducen un 30% de muerte citotoxicidad en PBMC tratadas durante 24 horas (Paino et al., 2012). En un estudio realizado anteriormente se evaluó el efecto de AuNP qts en poblaciones celulares derivadas de cultivo primario de PBMC. Los resultados mostraron que la población correspondiente a las células de linaje mieloide son las más sensibles al tratamiento, y que el porcentaje de muerte de esta población corresponde a la citotoxicidad obtenida en el total de PBMC (Álvarez-Chairez, 2016).

La diferencia entre la citotoxicidad observada en las líneas celulares de cáncer y las PBMC sugieren que la diferencia en la sensibilidad al tratamiento de AuNP es dependiente de mecanismos y proteínas asociados al tipo celular, un ejemplo son los

mecanismos de endocitosis los cuales son determinados por una gran variedad de factores propiamente de la célula como presencia o ausencia de proteínas caveolina-1, proteínas clatrina o mutaciones en genes ABC transportadores localizados en estas proteínas (Fra, Williamson, Simons, & Parton, 1994; Harris et al., 2002; Hatanaka et al., 1998; Ismail et al., 2009). Y factores externos a la célula como lo son tamaño de las AuNP, grosor de la corona de proteínas (Maiorano et al., 2010). Nuestros resultados mostraron que las PBMC tratadas con AuNP mostraban una citotoxicidad menor que células leucémicas Jurkat. Se ha reportado que las PBMC tienen una menor expresión de caveolina-1 y 2 con respecto a las células leucémicas, donde éstas proteínas se ven sobre expresadas (Hatanaka et al., 1998), también se ha reportado que células linfoides no presentan expresión de proteínas caveolina en la membrana plasmática (Harris et al., 2002), y que células de sangre periférica derivadas de linaje mieloide como macrófagos y neutrófilos lo cuales se han visto más sensibles al tratamiento con AuNP qts (Álvarez-Chairez., 2016) tienen una mayor expresión de caveolina-1 y caveolina-2. Lo cual puede explicar la baja citotoxicidad de las AuNP qts en células PBMC y la sensibilidad de Jurkat y k562. En otros estudios se evaluó el efecto del mecanismo de captación en diferentes líneas celulares utilizando AuNP de poliestireno de 60 nm. Se observó que las AuNP de poliestireno inducen diferente mecanismo citotóxico dependiente de la vía de endocitosis. En células no tumorales RAW (macrófagos), se observó que la endocitosis era dependiente de LAMP-1, una glicoproteína que facilita la adhesión a la célula y el paso a través de la membrana. También se observó que las AuNP eran transportadas en lisosomas y que la ruptura de la membrana lisosomal desencadenaba una señalización que conllevaba a la activación de tBid, bax, daño mitocondrial, liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , una elevada producción de ROS y activación de Caspasas. Por otro lado se observó que en células BEAS-2B (epitelio bronquial), las AuNP eran captas por endocitosis dependiente de caveolina-1, también se observó que no eran transportadas en vesículas y que había un ligero aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, que existía un daño mitocondrial pero no había activación de caspasas. La línea HEPA-1 de cáncer hepático no mostró ser sensible al tratamiento (Xia et al., 2008). Por lo que es necesario evaluar y determinar el tipo de captación de AuNP qts en ambas líneas celulares de leucemia y PBMC.

Después de la evaluar la citotoxicidad de las AuNP qts, fue necesario determinar si dicho efecto sobre la muerte celular era producto de los vehículos empleados en la síntesis. Para ello se realizó un análisis por citometría de flujo, utilizando marcaje AnnV/PI sobre la línea celular K562. Se midió el efecto del quitosano (Qts), ácido cloroáurico (H [AuCl<sub>4</sub>]) y como control se utilizaron AuNP Cs. En nuestros resultados se observó que tanto los vehículos, como las AuNP Cs inducen un menor porcentaje de muerte celular, ya que a la concentración que induce el 50% de muerte de k562 utilizando AuNP qts, sólo observamos un 9% de muerte inducida por el quitosano, un 7.4% con el (H [AuCl<sub>4</sub>]) y 4.9% con las AuNP Cs, después de 24 horas de tratamiento. Se encontró también que a la IC<sub>100</sub> con AuNP qts, sólo se induce alrededor de un 43%, 11%, y 5% de muerte celular utilizando Quitosano, ácido cloroáurico, y AuNP Cs, respectivamente. Otros estudios realizados utilizando la técnica de MTT muestran que el quitosano, el H [AuCl<sub>4</sub>]), y AuNP Cs tienen un menor efecto citotóxico en células de cáncer Hela (De León-Chávez., 2016) y HT29 (Álvarez-Chairez, 2016), comparados con las AuNP qts. Estos resultados corresponden con los estudios realizados por Connor y colaboradores, que demostraron que las AuNP Cs no tienen efecto citotóxico en K562 a 24, 48 y 72 horas y que el efecto del H [AuCl<sub>4</sub>) se observa a una concentración de 200µM a 72 horas de tratamiento (Connor et al., 2005). Por otra parte se realizó un estudio utilizando AuNP Cs de un tamaño menor a 10 nm en los cuales se observó que las AuNP Cs a una concentración de 1.6 µM inducen muerte celular por apoptosis en células A549 de carcinoma de pulmón pero no inducen citotoxicidad en células MCF-7 (Mohan et al., 2013), ni HepG2, lo cual se ha asociado a la localización de las AuNP una vez dentro de la célula y la activación de PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) (Patra, Banerjee, Chaudhuri, Lahiri, & Dasgupta, 2007).

Ya que evaluamos el efecto citotóxico de AuNP qts, AuNP Cs y vehículos empleados en la síntesis de AuNP qts en células k562, se estudió el efecto que tiene cada uno de los tratamientos mencionados sobre PBMC. Estos ensayos fueron realizados también por citometría de flujo, utilizando marcaje AnnV/PI. Los resultados muestran que las AuNP qts, quitosano, ácido cloroáurico y AuNP Cs poseen un bajo efecto citotóxico en células PBMC a las mismas concentraciones letales en células leucémicas IC<sub>50</sub> de k562 (100 µM) y Jurkat (30 µm). Estos resultados concuerdan con otros ensayos donde se evaluó el



efecto de AuNP qts, quitosano, (H [AuCl<sub>4</sub>]) y AuNP Cs (Álvarez-Chairez, 2016). A su vez también coinciden con los resultados mostrados por Paino donde se evaluó el efecto de AuNP Cs y AuNP PAMAM con un tamaño de 18 nm en células PBMC a una concentración de 50 µm por 24 horas (Paino, Marangoni, de Oliveira, Antunes, & Zucolotto, 2012). Por otro lado se ha demostrado que el quitosano puede incrementar la actividad metabólica de macrófagos, aumentar el número de PBMC y de células NK (Barbosa et al., 2016). En otro estudio se reportó que el quitosano puede inducir la producción de citocinas antiinflamatorias en macrófagos y citocinas pro inflamatoria en células dendríticas (Oliveira, Santos, Oliveira, Torres, & Barbosa, 2012).

Una vez determinada la citotoxicidad en células leucémicas y sanas, se evaluó mediante microscopia óptica si AuNP qts inducen cambios en la morfología de las células k562, observando que las células leucémicas tratadas con AuNP qts IC<sub>50</sub> muestran un tamaño menor con respecto a las células no tratadas, además de que se puede observar la formación de ampollas en la superficie celular y fragmentación de la estructura celular. Otros estudios demuestran que AuNP sintetizadas con *Zataria multiflora* inducen cambios en la estructura de la membrana, condensación de la cromatina, muestran características de apoptosis como formación de ampollas en la superficie de la membrana, a la vez que algunas de las células tratadas muestran características de muerte por necrosis como lo es el aumento de tamaño en células de cáncer ovárico Hela (Baharara et al., 2016). Posteriormente se evaluó si las AuNP inducían cambios en la morfología celular de linfocitos sanos tratados con AuNP qts IC<sub>50</sub>. Los resultados obtenidos demuestran que linfocitos tratados no muestran cambios aparentes en la morfología celular, principalmente en el tamaño y forma de las células, concordando con reportes anteriores donde se utilizaron AuNP Cs y AuNP PAMAM (Paino et al., 2012).

A su vez se evaluó el efecto de las AuNP qts en células linfoides estimuladas con Concanavalina A, un mitógeno que actúa estimulando el receptor de linfocitos T y activando la vía de señalización JAK1 (Krauss, Buttgerit, & Brand, 1999), a 24, 48 y 72 horas. Nuestros resultados mostraron que las AuNP qts no muestran un efecto citotóxico significativo sobre células linfoides estimuladas con un mitógeno a 24, 48 y 72 horas, lo que indica que este tipo de tratamiento no afecta a las células en fase de

replicación acelerada como células linfoides, células de la piel o el tracto digestivo como la mayorías de las quimioterapias (Lee, Ryan, & Doherty, 2014).

Después de obtener la  $IC_{50}$  en ambas líneas celulares de leucemia se evaluó el efecto de las AuNP qts sobre el ciclo celular para determinar el mecanismo completo de citotoxicidad y determinar si las AuNP qts inducen arresto sobre el ciclo. Esto se realizó por citometría de flujo utilizando como marcaje Yoduro de Propidio (PI). Nuestros resultados muestran que en ambas líneas celulares tratadas con AuNP qts no se observa arresto en el ciclo celular. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde también se sintetizaron AuNP utilizando el quitosano como agente reductor para tratar distintas líneas celulares como la A549 de cáncer de pulmón, donde no se observó arresto en el ciclo celular (Choi et al., 2012), Hela de cáncer cervico uterino donde tampoco se observa un arresto en alguna de las fases del ciclo celular (De León-Chávez., 2016). Otro estudio muestra que AuNP sintetizadas utilizando el extracto de planta *Sesuvium portulacastrum* L pueden inducir arresto en el ciclo celular en la fase G0/G2 y S en células de cáncer de pulmón A549 en un 17%, con respecto al control (Ramalingam et al., 2016). También se ha reportado que AuNP sintetizadas con distintas proporciones de poli etilenglicol (PEG) como agente reductor (partícula a, b, c, d, e, f, g, h) en tamaños de 5 y 13 nm a una concentración de 50  $\mu$ M de AuNP por 24 horas de tratamiento, pueden inducir disminuciones en la fase G2 de la línea celular CaCo2 de células epiteliales de colón, así como disminuir la fase G1/S de la línea PC3 de cáncer de próstata e incrementar la fase ase G2/M en la línea NIH3T3 de fibroblastos, en las tres líneas celulares se encontraron efectos similares en el ciclo celular, pero se observó que los efectos citotóxicos varían entre partículas dependiendo de la proporción entre los componentes de la síntesis (Uz, Bulmus, & Alsoy Altinkaya, 2016). De igual manera se estudió el efecto de AuNP Cs de un tamaño de 1.3 nm a una concentración de 12  $\mu$ M en las líneas celulares DU145 de cáncer de próstata y MDA-MB-231 de cáncer de mama, donde se observó que no había arresto en ninguna de las fases del ciclo celular (Coulter et al., 2012).

Con el fin de comprender el mecanismo citotóxico que inducen las AuNP qts en las células tratadas, se evaluó la integridad del potencial de membrana mitocondrial debido a que se ha demostrado que las mitocondrias están involucradas en la inducción de

muerte celular regulada (Halestrap et al., 2000). El análisis se llevó a cabo por citometría de flujo utilizando un marcador de actividad mitocondrial TMRE (Etil éster tetrametilrodamina). Nuestros resultados indican que después de 24 horas de tratamiento, las células tratadas con AuNP qts  $IC_{50}$  inducen un aumento en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, de alrededor del 89% en ambas líneas celulares. En un estudio previo se observó que AuNP qts inducen una disminución en la actividad mitocondrial en células Hela (De León-Chávez., 2016). Por otra parte se reporta que AuNP Cs conjugadas con butionina sulfoxamina (BSO), un inhibidor del glutatión de 13 nm de tamaño a una concentración de AuNP (10 $\mu$ m) BSO (0.5 mM) inducen la despolarización de la membrana mitocondrial en células A549 de cáncer pulmonar tratadas durante 48 horas. Esto fue evaluado a través de un marcaje JC-1 el cual mide emisiones de espectro dependiendo de la actividad alta o baja del potencial de membrana mitocondrial y que sólo puede ser leído por espectrofotometría, a diferencia del TMRE que tiñe las mitocondrias que mantienen la integridad de su potencial de membrana intacto y que puede ser leído por diversas técnicas (M. Liu et al., 2013). Al igual se evaluó el efecto de AuNP Cs de 1.4 nm de tamaño tratadas a una concentración de 100  $\mu$ m por 1, 6, 12, 18 y 24 horas con el marcaje JC-1. Se observó que el tratamiento induce daño mitocondrial, despolarización de la membrana interna en células Hela (Pan et al., 2009). El colapso del potencial de membrana mitocondrial está asociado a la formación de poros y un aumento en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, lo cual es dispar a una serie de eventos que pueden conducir a la muerte celular por distintas vías, como lo es la producción de especies reactivas de oxígeno, liberación abrupta de calcio al espacio intracelular o activación de caspasas.

Una vez que se determinó que las AuNP inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial se evaluó el efecto de AuNP qts sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto se realizó por citometría de flujo y se utilizó un marcaje DCFDA (dichlorofluorescein diacetate). Nuestros resultados muestran que las células leucémicas tratadas durante 24 horas con AuNP qts  $IC_{50}$  inducen un aumento en la producción de ROS en k562 del 30% y en Jurkat alrededor del 40%. Otros estudios demuestran que AuNP qts de un tamaño menor a 10 nm son capaces de inducir la producción de ROS en células Hela tratadas por 24 horas (De León-Chávez., 2016), y

MCF-7, donde se observó que al utilizar un inhibidor de especies reactivas de oxígeno la muerte celular disminuye, demostrando que la citotoxicidad inducida por las AuNP qts en células Hela y MCF-7 es dependiente de la producción de ROS (Rodríguez-Abrego, 2016). Por lo que es necesario evaluar si la citotoxicidad inducida por AuNP qts en ambas líneas celulares de leucemia es dependiente de la producción de ROS. Por otra parte se realizó un estudio donde se utilizaron AuNP Cs las cuales se observó no inducían muerte celular en células A549 hasta que se conjugaban con butionina sulfoxamina (BSO), un inhibidor de glutatión, molécula que actúa como antioxidante. Observaron que al utilizar las AuNP con BSO aumentaba la producción de ROS y la citotoxicidad (Y. Zhao et al., 2011). En otro estudio se evaluó el efecto de AuNP Cs en diferentes líneas celular no tumorales, se observó que células de pulmón MCR5 resistentes al tratamiento había una mayor expresión de genes involucrados con la regulación de la glutatión transferasa, glutatión reductasa y glutaredoxina moléculas involucradas con la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno (Chueh et al., 2014). Otros estudios sugieren que la producción de ROS depende del tamaño de la nanopartícula. Ya que se evaluó el efecto de AuNP Cs de 5, 10 y 30 nm incubadas por diferentes tiempos en células PBMC, se observó que AuNP Cs menores a 10 nm no inducían ROS comparado un control positivo y AuNP Cs de mayor tamaño (Piryazev et al., 2013). La producción de especies reactivas de oxígeno está asociada a diferentes mecanismos de citotoxicidad ya que se ha reportado que pueden inducir daño sobre el DNA, activación de proteínas como p53, H2AX, inducir la liberación de calcio, así como también la activación de caspasas (Wan et al., 2012).

Una vez que se determinó que las AuNP qts inducen un daño mitocondrial y producción de ROS. Se evaluó mediante Western blot la expresión de proteínas relacionadas con la muerte celular regulada mediada por apoptosis con el fin de determinar el mecanismo de citotoxicidad inducido por nuestro tratamiento. Nuestros resultados mostraron que las células k562 tratadas con AuNP qts IC<sub>50</sub> muestran una mayor expresión de caspasa 8 activada después de 12 y 24 horas de tratamiento. En células Jurkat se observa una mayor expresión de caspasa 8 y caspasa 9 activas después de 12 horas de tratamiento con AuNP IC<sub>50</sub>. De igual manera Young y colaboradores observaron una mayor expresión de caspasa 8 activa en células de cáncer de pulmón A549 tratadas con AuNP

qts por 24 horas (Choi et al., 2012). Otros estudios reportan que el uso de AuNP sintetizadas con extracto *Zataria multiflora* de 10 nm inducen la activación de caspasa 3 y 9 en células Hela (Baharara et al., 2016). Por otro parte se ha reportado que AuNP Cs aumentan la expresión de mRNA de Bax, p53, Caspasa 7 y 9 en células MCF-7 (Selim & Hendi, 2012). También se observó que AuNP de borohidruro de sodio conjugadas con anticuerpos anti- VEGF inducen la expresión de caspasa 3 activa, PARP (Poly (ADP-ribosa) polymerase) y proteínas bcl-2 (Mukherjee et al., 2007). Sin embargo se ha demostrado que la presencia de caspasa 8 activa no indica que la muerte celular sea dependiente de su activación (Darding & Meier, 2012; M. Liu et al., 2013), Ya que se reportado que al inhibir la activación de caspasas utilizando un inhibidor como el zVAD se puede inducir otros tipos de muerte celular (Y.-T. Wu et al., 2011). Por lo que se evaluó por citometría de flujo si la muerte celular inducida por AuNP qts dependía de caspasas. Para ello se utilizó un inhibidor de caspasas llamado QVD-Oph el cual es un potente inhibidor de caspasa 8, 9, 3 (Caserta et al., 2003), el cual se ha demostrado que a bajas concentraciones no tienen efecto citotóxico en células leucémicas (Caserta et al., 2003; Kuželová et al., 2011). Nuestros resultados mostraron que al utilizar el inhibidor QVD-Oph + AuNP qts  $IC_{50}$  no se encontró un menor porcentaje de muerte celular con respecto al tratamiento con AuNP qts lo que indica que la muerte celular inducida con AuNP qts no es dependiente de la activación de caspasas. Además se observó que los porcentajes de muerte celular aumentaban significativamente, lo que sugiere que el efecto citotóxico de las AuNP qts en células k562 y Jurkat involucra la participación de otros mecanismos de muerte celular. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados con AuNP qts y QVD-Oph, donde se observa que el porcentaje de muerte celular aumenta al inhibir caspasas en células Hela (De León-Chávez., 2016) y MCF7 (Rodríguez-Abrego., 2016). En otro estudio se demostró que la apoptosis no era el único mecanismo involucrado en la citotoxicidad de AuNP Cs conjugadas con BSO en células A549 al observar un aumento en el porcentaje de muerte celular en células tratadas con AuNP BSO + zVAD, un inhibidor de caspasas, demostrando que el mecanismo citotóxico puede involucrar diferentes tipos de muerte celular (M. Liu et al., 2013).

## **X. CONCLUSIONES**

1. AuNP qts tienen son más estables que AuNP Cs
2. AuNP qts diluidas en RPMI tienen una mayor estabilidad sin afectar tamaño y toxicidad.
3. AuNP qts inducen la translocación de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática en las líneas celular k562 y Jurkat.
4. AuNP qts inducen baja citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica PBMC.
5. El efecto de las AuNP qts es mayor que el de sus vehículos y AuNP Cs en células k562.
6. AuNP qts, vehículos y AuNP Cs inducen baja citotoxicidad en PBMC.
7. AuNP qts inducen baja citotoxicidad en linfocitos estimulados con Concanavalina A.
8. AuNP qts no inducen arresto en el ciclo celular en k562 y Jurkat.
9. AuNP qts inducen daño mitocondrial a través de la producción de ROS y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial.
10. AuNP qts aumentan la expresión de caspasa 8 activa en k562 y Jurkat.
11. AuNP qts inducen muerte celular regulada independiente de caspasas en k562 y Jurkat.

## **XI. PERSPECTIVAS**

1. Estudiar la presencia de corona de proteínas en AuNP qts diluidas en medio de cultivo celular RPMI
2. Estudiar la composición de la corona de proteínas en AuNP qts RPMI.
3. Estudiar el efecto de AuNP qts inhibiendo vías de endocitosis.
4. Evaluar la muerte celular con AuNP qts utilizando un inhibidor de ROS en k562 y Jurkat.
5. Evaluar la expresión de proteínas RIPK1, RIPK3 y MLKL en células k562 y Jurkat tratadas con AuNP qts.
6. Evaluar si la muerte celular inducida por AuNP qts es inmunogenica midiendo DAMPS a través de la expresión de proteínas HSP90, HSP70 y Calreticulin en k562 y Jurkat.
7. Evaluar el efecto *in vivo* de AuNP qts en ratones.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abadeer, N. S., & Murphy, C. J. (2016). Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 120(9), 4691–4716.  
<http://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11232>
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). From pluripotent stem cells to B and T cells. *Chapter* 8.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., & Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, 9(2), 423–432. [http://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00442-2](http://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00442-2)
- Airiau, K., Mahon, F. X., Josselin, M., Jeanneteau, M., Turcq, B., & Belloc, F. (2012). ABT-737 increases tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells through XIAP downregulation and sensitizes CD34 + CD38 - population to imatinib. *Experimental Hematology*, 40(5), 367–378. <http://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.01.004>
- AlanáCreighton, J. (1991). Ultraviolet–visible absorption spectra of the colloidal metallic elements. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 87(24), 3881–3891.
- American Cancer Society. (2016a). Leucemia mieloide crónica.
- American Cancer Society. (2016b). Leukemia – Acute Lymphocytic ( Adults ) What is acute lymphocytic leukemia ?
- Arana-Trejo, R. M., Ruíz Sánchez, E., Ignacio-Ibarra, G., De La Báez Fuente, E., Garces, O., Gómez Morales, E., ... Kofman, S. (2002). BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clinical and Laboratory Haematology*, 24(3), 145–150. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2257.2002.00413.x>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ... Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), blood-2016-03-643544.  
<http://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Arvizo, R. R., Saha, S., Wang, E., Robertson, J. D., & Bhattacharya, R. (2013). Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. <http://doi.org/10.1073/pnas.1214547110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1214547110>
- Ashkenazi, A., & Salvesen, G. (2014a). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(August), 337–356. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013226>



- Ashkenazi, A., & Salvesen, G. (2014b). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 337–356. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013226>
- Baccarani, M., Pileri, S., Steegmann, J. L., Muller, M., Soverini, S., & Dreyling, M. (2012). Chronic myeloid leukemia: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23(SUPPL. 7). <http://doi.org/10.1093/annonc/mds228>
- Baharara, J., Ramezani, T., Divsalar, A., Mousavi, M., & Seyedarabi, A. (2016). Induction of Apoptosis by Green Synthesized Gold Nanoparticles Through Activation of Caspase-3 and 9 in Human Cervical Cancer Cells, 8(2), 75–83.
- Barbosa, A., Caires, H. R., Esteves, T., Quelhas, P., Navarro, M., & Almeida, C. R. (2016). Macrophage interactions with polylactic acid and chitosan scaffolds lead to improved recruitment of human mesenchymal stem / stromal cells : a comprehensive study with different immune cells. <http://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.3461748>.
- Belizario, J., Vieira-Cordeiro, L., & Enns, S. (2015). Necroptotic cell death signaling and execution pathway: Lessons from knockout mice. *Mediators of Inflammation*, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/128076>
- Bennetts, P. S., & Pierce, J. D. (2010). Apoptosis: Understanding programmed cell death for the CRNA. *AANA Journal*, 78(3), 237–245.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2010). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(2), 99–109. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2070>.Pyroptosis
- Boca, S. C., Potara, M., Toderas, F., Stephan, O., Baldeck, P. L., & Astilean, S. (2011). Uptake and biological effects of chitosan-capped gold nanoparticles on Chinese Hamster Ovary cells. *Materials Science and Engineering C*, 31(2), 184–189. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2010.08.015>
- Boyles, M. S. P., Kristl, T., Andosch, A., Zimmermann, M., Tran, N., Casals, E., ... Duschl, A. (2015). Chitosan functionalisation of gold nanoparticles encourages particle uptake and induces cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in phagocytic cells, as well as enhancing particle interactions with serum components. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 84. <http://doi.org/10.1186/s12951-015-0146-9>
- Brana, C., Benham, C., & Sundstrom, L. (2002). A method for characterising cell death in vitro by combining propidium iodide staining with immunohistochemistry. *Brain Research Protocols*, 10(2), 109–114. [http://doi.org/10.1016/S1385-299X\(02\)00201-5](http://doi.org/10.1016/S1385-299X(02)00201-5)
- Caserta, T. M., Smith, A. N., Gultice, A. D., Reedy, M. A., & Brown, T. L. (2003). Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*, 8(4), 345–352.

<http://doi.org/10.1023/A:1024116916932>

- Chen, Z., Wang, Z., Chen, X., Xu, H., & Liu, J. (2013). Chitosan-capped gold nanoparticles for selective and colorimetric sensing of heparin. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(9).  
<http://doi.org/10.1007/s11051-013-1930-9>
- Cheng, X., Tian, X., Wu, A., Li, J., Tian, J., Chong, Y., ... Ge, C. (2015). Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(37), 20568–20575.  
<http://doi.org/10.1021/acsami.5b04290>
- Chiaretti, S., & Foà, R. (2009). T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 94(2), 160–162.  
<http://doi.org/10.3324/haematol.2008.004150>
- Chithrani, B. D., & Chan, W. C. W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7(6), 1542–1550.  
<http://doi.org/10.1021/nl070363y>
- Choi, S. Y., Jang, S. H., Park, J., Jeong, S., Park, J. H., Ock, K. S., ... Lee, S. Y. (2012). Cellular uptake and cytotoxicity of positively charged chitosan gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12). <http://doi.org/10.1007/s11051-012-1234-5>
- Chueh, P. J., Liang, R.-Y., Lee, Y.-H., Zeng, Z.-M., & Chuang, S.-M. (2014). Differential cytotoxic effects of gold nanoparticles in different mammalian cell lines. *Journal of Hazardous Materials*, 264(2014), 303–312. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.11.031>
- Colina, M., Ayala, A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., ... Montilla, B. (2014). Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangejos escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(1), 21–43. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4554249&info=resumen&idioma=SPA>
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J., & Wyatt, M. D. (2005). Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*, 1(3), 325–327.  
<http://doi.org/10.1002/sml.200400093>
- Corbin A. (2011). Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity, 121(1). <http://doi.org/10.1172/JCI35721DS1>
- Corzo Lucioni, A. (2012). Síntesis de nanopartículas de oro obtenidas por reducción de H[AuCl<sub>4</sub>]. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 78(2), 79–90. Retrieved from [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2012000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

- Coulter, J. A., Jain, S., Butterworth, K. T., Taggart, L. E., Dickson, G. R., McMahon, S. J., ... Prise, K. M. (2012). Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2673–2685. <http://doi.org/10.2147/IJN.S31751>
- D.L, V. (2002). Apoptosis Timeline. *Cell Death and Differentiation*, 9(Apr 2002), 349–354. <http://doi.org/10.1038/sj/onc/4400990>
- D'Amours, D., Sallmann, F. R., Dixit, V. M., & Poirier, G. G. (2001). Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 20), 3771–3778.
- Darding, M., & Meier, P. (2012). IAPs: Guardians of RIPK1. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 58–66. <http://doi.org/10.1038/cdd.2011.163>
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., & Traganos, F. (1997). Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*, 27(1), 1–20. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970101\)27:1<1::AID-CYTO2>3.0.CO;2-L](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970101)27:1<1::AID-CYTO2>3.0.CO;2-L)
- Dass, C. R., & Choong, P. F. M. (2008). The use of chitosan formulations in cancer therapy. *Journal of Microencapsulation*, 25(4), 275–279. <http://doi.org/10.1080/02652040801970461>
- Dauer, M., Obermaier, B., Herten, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., ... Eigler, A. (2003). Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *The Journal of Immunology*, 170, 4069–4076. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.170.8.4069>
- De Kouchkovsky, I., & Abdul-Hay, M. (2016). “Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update.” *Blood Cancer Journal*, 6(7), e441. <http://doi.org/10.1038/bcj.2016.50>
- Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., Melo, J. V, Dc, W., Deininger, M. W. N., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia Review article The molecular biology of chronic myeloid leukemia, 96(10), 3343–3356.
- Demarest, R. M., Ratti, F., & Capobianco, a J. (2008). It's T-ALL about Notch. *Oncogene*, 27(38), 5082–5091. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.222>
- Diamantis, A., Magiorkinis, E., Sakorafas, G. H., & Androutsos, G. (2008). A brief history of apoptosis: From ancient to modern times. *Onkologie*, 31(12), 702–706. <http://doi.org/10.1159/000165071>
- Ding, W. X., & Yin, X. M. (2012). Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological Chemistry*, 393(7), 547–564. <http://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>
- Dwight S. Seferos, Andrew E. Prigodich, David A. Giljohann, Pinal C. Patel, and C. A. M., & Proximity, I. (2011). Polyvalent DNA Nanoparticle Conjugates Stabilize Nucleic Acids, 4(164), 308–311.

<http://doi.org/10.1126/scisignal.2001449.Engineering>

- Dzierzak, E., & Philipsen, S. (2013). Erythropoiesis: development and differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(4), 1–16. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a011601>
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). MAMMALIAN CASPASES : STRUCTURE , ACTIVATION , SUBSTRATES , 383–424.
- Eck, W., Craig, G., Sigdel, A., Ritter, G., Old, L. J., Tang, L., ... Mason, M. D. (2008). Antibodies as Targeted Labeling Agents for Human Pancreatic Carcinoma Tissue. *ACS Nano*, 2(11), 2263–2272. <http://doi.org/10.1021/nn800429d>
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., & Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3471–3480. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.010>
- Ekert, P. G., & Vaux, D. L. (1997). Apoptosis and the immune system. *British Medical Bulletin*, 53(3), 591–603. <http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011632>
- Elmore, S. (2010). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death Susan, 48(Suppl 2), 1–6. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening>
- Erika Haydu J, A. A. F. (2010). Early T-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP T-ALL), 48(Suppl 2), 1–6. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8.Screening>
- Fabbro, D. (2012). A new STATus in CML. *Nature Publishing Group*, 8(3), 228–229. <http://doi.org/10.1038/nchembio.900>
- Ferrando, A. . (2011). The role of NOTCH1 signaling in T-ALL, 4(164), 1–14. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2001449.Engineering>
- Flex, E., Petrangeli, V., Stella, L., Chiaretti, S., Hornakova, T., Knoops, L., ... Tartaglia, M. (2008). Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(4), 751–8. <http://doi.org/10.1084/jem.20072182>
- Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K., & Parton, R. G. (1994). Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 30745–30748.
- G. Koopman, C.P.M. Reutelingsperger, G.A.M. Kuijten, R.M.J. Keehnen, S.T. Pals, and M. H. J. van O. (1994). Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserine Expression on B Cells Undergoing Apoptosis, 3(c), 11–12.
- Gacén, J., & Gacén, I. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter (U.P.C)*, 67–71. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/6421/1/Article06a.pdf>

- Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Vitale, I., Aaronson, S. a, Abrams, J. M., Adam, D., ... Kroemer, G. (2014). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death and Differentiation*, (2014), 1–16. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.137>
- Gamrekelashvili, J., Greten, T. F., & Korangy, F. (2015). Immunogenicity of necrotic cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(2), 273–283. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1741-x>
- Garaiova, Z., Strand, S. P., Reitan, N. K., L??lu, S., St??rset, S. T., Berg, K., ... De L. Davies, C. (2012). Cellular uptake of DNA-chitosan nanoparticles: The role of clathrin- and caveolae-mediated pathways. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1043–1051. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.016>
- Gemma Kelly, A. strasser. (2007). *The essential role of evasion from cell death in cancer. The Pezcoller Foundation Journal* (Vol. 16). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-385524-4.00002-7>The
- Giménez-Cassina, A., & Danial, N. N. (2015). Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 26(4), 165–75. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2015.02.004>
- Granatowicz, A., Piatek, C. I., Moschiano, E., El-Hemaidi, I., Armitage, J. D., & Akhtari, M. (2015). An overview and update of chronic myeloid leukemia for primary care physicians. *Korean Journal of Family Medicine*, 36(5), 197–202. <http://doi.org/10.4082/kjfm.2015.36.5.197>
- Greenwood, R. (2003). Review of the measurement of zeta potentials in concentrated aqueous suspensions using electroacoustics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 106(1–3), 55–81. [http://doi.org/10.1016/S0001-8686\(03\)00105-2](http://doi.org/10.1016/S0001-8686(03)00105-2)
- Guillermo J Ruiz-Argüelles, Guillermo J Ruiz Delgado, J. G.-E. (2013). ¿Es necesario el trasplante de médula ósea en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda? *Revista de Hematología*, 14(16), S1–S4. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Hales, E. C., Taub, J. W., & Matherly, L. H. (2014). New insights into Notch1 regulation of the PI3K-AKT-mTOR1 signaling axis: Targeted therapy of ??-secretase inhibitor resistant T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cellular Signalling*, 26(1), 149–161. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.09.021>
- Halestrap, A. P., Doran, E., Gillespie, J. P., & O'Toole, A. (2000). Mitochondria and cell death. *Biochemical Society Transactions*, 28(2), 170–7. <http://doi.org/10.1042/bst0280170>
- Hamilton, A., Helgason, G. V., Schemionek, M., Zhang, B., Myssina, S., Allan, E. K., ... Holyoake, T. L. (2015). Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival, 119(6), 1501–1511. <http://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326843>.

- Han, J., Zhong, C.-Q., & Zhang, D.-W. (2011). Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature Immunology*, 12(12), 1143–9. <http://doi.org/10.1038/ni.2159>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, J., Werling, D., Koss, M., Monaghan, P., Taylor, G., & Howard, C. J. (2002). Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells. *Immunology*, 105(2), 190–195. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01362.x>
- Hasanali, Z. S. (2015). Epigenetic therapy overcomes treatment resistance in T-cell prolymphocytic leukemia, 7(293), 37–54. <http://doi.org/10.1016/bs.mcb.2015.01.016>. Observing
- Hassan, M., Watari, H., Abualmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/150845>
- Hatanaka, M., Maeda, T., Ikemoto, T., Mori, H., Seya, T., & Shimizu, A. (1998). Expression of caveolin-1 in human T cell leukemia cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(2), 382–7. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9744>
- Hauck, T. S., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2008). Assessing the effect of surface chemistry on gold nanorod uptake, toxicity, and gene expression in mammalian cells. *Small*, 4(1), 153–159. <http://doi.org/10.1002/sml.200700217>
- Huang, M., Khor, E., & Lim, L. Y. (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344–353. <http://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5>
- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13–28. <http://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
- Ichim, G., & Tait, S. W. G. (2016). A fate worse than death : apoptosis as an oncogenic process. *Nature Publishing Group*. <http://doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
- INEGI. (2013). “ Estadísticas a Propósito Del Día Internacional Contra El Cáncer De Mama .” *Inegi*, 24, 1–17.
- Ismair, M. G., Häusler, S., Stuermer, C. A., Guyot, C., Meier, P. J., Roth, J., & Stieger, B. (2009). ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes. *Hepatology*, 49(5), 1673–1682.

<http://doi.org/10.1002/hep.22807>

- Jabbour, E. J., & Kanterjian, H. (2014). CME Information : Chronic myeloid leukemia : 2014 update. *American Journal of Hematology*, 89(5), 547–556. <http://doi.org/10.1002/ajh.34>
- Jain, S., Hirst, D. G., & O'Sullivan, J. M. (2012). Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *The British Journal of Radiology*, 85(1010), 101–113. <http://doi.org/10.1259/bjr/59448833>
- Jáuregui-haza, R. O. U. J. (2012). Las nanopartículas como portadores de fármacos : características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers : characteristics and perspectives, 43(3).
- Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 6), 1251–1258. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.195057>
- Kannan, K. (2015). Philadelphia Chromosome Positive Precursor T Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 31(1), 154–155. <http://doi.org/10.1007/s12288-013-0278-8>
- Kaushik, N. K., Kaushik, N., Yoo, K. C., Uddin, N., Kim, J. S., Lee, S. J., & Choi, E. H. (2016). Low doses of PEG-coated gold nanoparticles sensitize solid tumors to cold plasma by blocking the PI3K/AKT-driven signaling axis to suppress cellular transformation by inhibiting growth and EMT. *Biomaterials*, 87, 118–130. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.014>
- Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4), 317–337. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxp017>
- Kerr, J. F. R. (1965). A HISTOCHEMICAL STUDY OF HYPERTROPHY AND ISCHAEMIC INJURY OF RAT LIVER WITH SPECIAL REFERENCE TO CHANGES IN LYSOSOMES CXII-CXVII experimental procedures ( Appelmans , Wattiaux and de Duve , 1955 ; for cell necrosis in damaged tissues ( de Duve and Beaufay, 90.
- Kim, J. H., Kim, J. H., Kim, K.-W., Kim, M. H., & Yu, Y. S. (2009). Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology*, 20(50), 505101. <http://doi.org/10.1088/0957-4484/20/50/505101>
- Kim, J. W., Choi, E. J., & Joe, C. O. (2000). Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP. *Oncogene*, 19(39), 4491–4499. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1203796>
- Kim, M. O., Moon, D. O., Kang, C. H., Choi, Y. H., Lee, J. D., & Kim, G. Y. (2013). Water-soluble chitosan sensitizes apoptosis in human leukemia cells via the downregulation of bcl-2 and dephosphorylation of akt. *Journal of Food Biochemistry*, 37(3), 270–277. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00628.x>

- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited.pdf. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(95 mL), 15700–15707. <http://doi.org/10.1021/jp061667w>
- Knoechel, B., & Aster, J. C. (2015). Metabolic Mechanisms of Drug Resistance in Leukemia. *Cell Metabolism*, 22(5), 759–760. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.005>
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012>
- Krauss, S., Buttgereit, F., & Brand, M. D. (1999). Effects of the mitogen concanavalin A on pathways of thymocyte energy metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1412(2), 129–138. [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00058-4](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00058-4)
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E., Baehrecke, E., ... Melino, G. (2009). Classification of Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3–11. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.150.Classification>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ... Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), 3–11. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>
- Kumar, N., Patel, A. K., Kumari, N., & Kumar, A. (2014). A review on chitosan nanoparticles for cancer treatment. *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(4), 63–65.
- Kuželová, K., Grebeňová, D., & Brodská, B. (2011). Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(11), 3334–3342. <http://doi.org/10.1002/jcb.23263>
- Labi, V., & Erlacher, M. (2015). How cell death shapes cancer. *Cell Death & Disease*, 6(3), e1675. <http://doi.org/10.1038/cddis.2015.20>
- Lamkanfi, M. (2011). Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nature Reviews. Immunology*, 11(3), 213–20. <http://doi.org/10.1038/nri2936>
- Lankheet, N. A. G., Hillebrand, M. J. X., Rosing, H., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Huitema, A. D. R. (2013). Method development and validation for the quantification of dasatinib, erlotinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, nilotinib, sorafenib and sunitinib in human plasma by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 27(4), 466–476. <http://doi.org/10.1002/bmc.2814>
- Lavrik, I., Krueger, a, Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., & Kirchhoff, S. (2003). The



- active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 144–145. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401156>
- Lee, C. S., Ryan, E. J., & Doherty, G. a. (2014). Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(14), 3751–61. <http://doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.3751>
- Leukemia & Lymphoma Society. (2014). Leucemia linfoblástica aguda.
- Levinson, W. E. (2008). Review of Medical Microbiology and Immunology. *Lange Basic Science*, 1919, 1147–1172. <http://doi.org/10.1507/endocrj>.
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanopartides. *Small*, 4(1), 26–49. <http://doi.org/10.1002/sml.200700595>
- Li, X., Robinson, S. M., Gupta, A., Saha, K., Jiang, Z., Moyano, D. F., ... Rotello, V. M. (2014). Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano*, 8(10), 10682–10686. <http://doi.org/10.1021/nn5042625>
- Lin, J., Zhang, H., Chen, Z., & Zheng, Y. (2010). Penetration of lipid membranes by gold nanoparticles: Insights into cellular uptake, cytotoxicity, and their relationship. *ACS Nano*, 4(9), 5421–5429. <http://doi.org/10.1021/nn1010792>
- Liu, D., Zhang, J., Yi, C., & Yang, M. (2010). The effects of gold nanoparticles on the proliferation, differentiation, and mineralization function of MC3T3-E1 cells in vitro. *Chinese Science Bulletin*, 55(11), 1013–1019. <http://doi.org/10.1007/s11434-010-0046-1>
- Liu, M., Gu, X., Zhang, K., Ding, Y., Wei, X., Zhang, X., & Zhao, Y. (2013). Gold nanoparticles trigger apoptosis and necrosis in lung cancer cells with low intracellular glutathione. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(8). <http://doi.org/10.1007/s11051-013-1745-8>
- Liu, Y., & Levine, B. (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 367–76. <http://doi.org/10.1038/cdd.2014.143>
- Lowe, S. W., & Lin, a W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485–495. <http://doi.org/10.1093/carcin/21.3.485>
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., & Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14265–70. <http://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>
- Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Mrad, R. L., Plenchette, S., Simard, C., Enwere, E., ... Korneluk, R. G. (2008). Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(33), 11778–83.  
<http://doi.org/10.1073/pnas.0711122105>
- Maiorano, G., Sabella, S., Sorce, B., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Cingolani, R., & Pompa, P. P. (2010). Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*, 4(12), 7481–7491. <http://doi.org/10.1021/nn101557e>
- Majno, G., & Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3–15. <http://doi.org/7856735>
- Mariño, G., & Kroemer, G. (2013). Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Research*, 23(11), 1247–8. <http://doi.org/10.1038/cr.2013.115>
- Martinez-Torres, A. C., Quiney, C., Attout, T., Boullet, H., Herbi, L., Vela, L., ... Susin, S. A. (2015). CD47 Agonist Peptides Induce Programmed Cell Death in Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells via PLC $\gamma$ 1 Activation: Evidence from Mice and Humans. *PLoS Medicine*, 12(3), 1–37. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001796>
- Maru, Y. (2012). Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Cancer Science*, 103(9), 1601–1610. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02346.x>
- Micheau, O., & Rg Tschopp, J. (2003). Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes of these receptors delivers a powerful and rapid proapoptotic signal through a DD-mediated recruitment of the adaptor protein FADD and the formation of the so-called. *Cell*, 114, 181–190. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00521-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00521-X)
- Mizushima, N. (2007). Autophagy : process and function, 2861–2873.  
<http://doi.org/10.1101/gad.1599207.eralize>
- Mohan, J. C., Praveen, G., Chennazhi, K. P., Jayakumar, R., & Nair, S. V. (2013). Functionalised gold nanoparticles for selective induction of in vitro apoptosis among human cancer cell lines. *Journal of Experimental Nanoscience*, 8(1), 32–45. <http://doi.org/10.1080/17458080.2011.557841>
- Mukherjee, P., Bhattacharya, R., Bone, N., Lee, Y. K., Patra, C. R., Wang, S., ... Mukhopadhyay, D. (2007). Potential therapeutic application of gold nanoparticles in B-chronic lymphocytic leukemia (BCLL): enhancing apoptosis. *Journal of Nanobiotechnology*, 5(CII), 4.  
<http://doi.org/10.1186/1477-3155-5-4>
- Mullighan, C. G. (2012). The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2012, 389–96. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.389>
- Murugan, M., Anthony, K. J. P., Jeyaraj, M., Rathinam, N. K., & Gurunathan, S. (2014). Biofabrication of

- gold nanoparticles and its biocompatibility in human breast adenocarcinoma cells (MCF-7). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1713–1719.  
<http://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.08.021>
- Nagamos, R. N., Gentile, T., & Vajpayee, N. (2016). Erythroid blast crisis in chronic myelogenous leukemia: Case report and review of literature. *Leukemia Research Reports*, 5, 18–22.  
<http://doi.org/10.1016/j.lrr.2016.04.002>
- Nichols, B. A., Bainton, D. F., & Farquhar, M. G. (1971). Differentiation of monocytes. Origin, nature, and fate of their azurophil granules. *Journal of Cell Biology*, 50(2), 498–515.  
<http://doi.org/10.1083/jcb.50.2.498>
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448–3459. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>
- O'Brien, R. W., Midmore, B. R., Lamb, A., & Hunter, R. J. (1990). Electroacoustic studies of moderately concentrated colloidal suspensions. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 90, 301.  
<http://doi.org/10.1039/dc9909000301>
- O'Dwyer, M. . ., & Druker, B. J. (2000). STI571: an inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase for the treatment of chronic myelogenous leukaemia. *The Lancet Oncology*, 1, 207–211.  
[http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00149-2](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00149-2)
- Oberst, A., & Green, D. R. (2011). It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(November), 757–763.  
<http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.933275.Potential>
- Oh, N., & Park, J. H. (2014). Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, 9(SUPPL.1), 51–63. <http://doi.org/10.2147/IJN.S26592>
- Okada, R., Kondo, T., Matsuki, F., Takata, H., & Takiguchi, M. (2008). Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *International Immunology*, 20(9), 1189–1199.  
<http://doi.org/10.1093/intimm/dxn075>
- Oliveira, M. I., Santos, S. G., Oliveira, M. J., Torres, A. L., & Barbosa, M. A. (2012). Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. *European Cells and Materials*, 24, 136–153.
- Onai, N., Zhang, Y., Yoneyama, H., Kitamura, T., Ishikawa, S., & Matsushima, K. (2015). Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow – hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1 – intrakine, 96(6), 2074–2081.

- Ortega Sánchez, María Luisa Osnaya Ortega, J. V. R. B. (2008). Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral*, 12(6), 551–558. <http://doi.org/10.1016/B978-84-8174-886-4.50009-X>
- Ortiz-hidalgo, C. (2013). Notas sobre la historia de la leucemia, 58–69.
- Otten, H. G., van Ginkel, W. G. J., Hagenbeek, a, & Petersen, E. J. (2004). Prevalence and clinical significance of resistance to perforin- and FAS-mediated cell death in leukemia. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 18(8), 1401–5. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2403414>
- Paino, I. M. M., Marangoni, V. S., de Oliveira, R. de C. S., Antunes, L. M. G., & Zucolotto, V. (2012). Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters*, 215(2), 119–125. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.025>
- Pan, Y., Leifert, A., Ruau, D., Neuss, S., Bornemann, J., Schmid, G., ... Jahnen-Dechent, W. (2009). Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, 5(18), 2067–2076. <http://doi.org/10.1002/sml.200900466>
- Patra, H. K., Banerjee, S., Chaudhuri, U., Lahiri, P., & Dasgupta, A. K. (2007). Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.nano.2007.03.005>
- Paul, M. K., & Mukhopadhyay, A. K. (2004). Tyrosine kinase - Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, 1(2), 101–115. <http://doi.org/10.7150/ijms.1.101>
- Pérez, E. H., Alarcón-, F. J., Almanza-pérez, J. C., & López-díaz, N. E. (2010). Receptores de muerte , apoptosis y su relación con la fibrosis hepática, 11(2), 54–62.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1644(2–3), 83–94. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2003.08.012>
- Piryazev, A. P., Azizova, O. A., Aseichev, A. V., Dudnik, L. B., & Sergienko, V. I. (2013). Effect of gold nanoparticles on production of reactive oxygen species by human peripheral blood leukocytes stimulated with opsonized zymosan. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 156(1), 101–103. <http://doi.org/10.1007/s10517-013-2288-9>
- Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21777–21781. <http://doi.org/10.1074/jbc.R800084200>
- Proikas-Cezanne, T., & Pfisterer, S. G. (2009). Chapter 16 Assessing Mammalian Autophagy by WIPI-1/Atg18 Puncta Formation. *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 451). Elsevier Inc. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03616-1](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03616-1)

- Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., ... Pear, W. S. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, 11(3), 299–308. [http://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80105-3](http://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80105-3)
- Quail, D. F., Bowman, R. L., Akkari, L., Quick, M. L., Schuhmacher, A. J., Huse, J. T., ... Joyce, J. A. (2016). The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science*, 352(6288), aad3018-aad3018. <http://doi.org/10.1126/science.aad3018>
- Radhakrishnan, R., Suni, I. I., Bever, C. S., & Hammock, B. D. (2014). Impedance biosensors: Applications to sustainability and remaining technical challenges. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(7), 1649–1655. <http://doi.org/10.1021/sc500106y>
- Ramalingam, V., Revathidevi, S., Shanmuganayagam, T., & Muthulakshmi, L. (2016). RSC Advances Biogenic gold nanoparticles induce cell cycle arrest through oxidative stress and sensitize mitochondrial membranes in A549 lung cancer cells. *RSC Advances*, 6, 20598–20608. <http://doi.org/10.1039/C5RA26781A>
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesàro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1–2), 219–228. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>
- Rech de Laval, V., Deleage, G., Aouacheria, A., & Combet, C. (2014). BCL2DB: database of BCL-2 family members and BH3-only proteins. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2014, 1–7. <http://doi.org/10.1093/database/bau013>
- Reddy, T., & Transfer, C. (2008). Cell Growth Protocol for Jurkat Cell Line Jurkat ( ATCC number TIB-152 ) cell culture and formaldehyde cross- linking, 7–8.
- Reuveni, T., Motiei, M., Romman, Z., Popovtzer, A., & Popovtzer, R. (2011). Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study. *International Journal of Nanomedicine*, 6(12), 2859–2864. <http://doi.org/10.1021/nl8029114>
- Rinaudo, M., Pavlov, G., & Desbrières, J. (1999). Solubilization of Chitosan in Strong Acid Medium. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 5(March 2015), 267–276. <http://doi.org/10.1080/10236669908009742>
- Roy, S., & Debnath, J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. *Seminars in Immunopathology*, 32(4), 383–396. <http://doi.org/10.1007/s00281-010-0213-0>
- Rybaczek, D., & Maszewski, J. (2007). Phosphorylation of H2AX histones in response to double-strand breaks and induction of premature chromatin condensation in hydroxyurea-treated root meristem cells of *Raphanus sativus*, *Vicia faba*, and *Allium porrum*. *Protoplasma*, 230(1–2), 31–39. <http://doi.org/10.1007/s00709-006-0192-0>

- Sabuncu, A. C., Grubbs, J., Qian, S., Abdel-Fattah, T. M., Stacey, M. W., & Beskok, A. (2012). Probing nanoparticle interactions in cell culture media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 96–102. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.02.022>
- Schmidt, S., Rainer, J., Ploner, C., Presul, E., Riml, S., & Kofler, R. (2004). Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: Molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death and Differentiation*, 11, S45–S55. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401456>
- Selim, M. E., & Hendi, A. a. (2012). Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 13(4), 1617–20. <http://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.4.1617>
- Shanafelt, T. (2013). Treatment of older patients with chronic lymphocytic leukemia: key questions and current answers. *Hematology*, 2013, 158–167. <http://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.158>
- Shibutani, S. T., Saitoh, T., Nowag, H., Munz, C., & Yoshimori, T. (2015). Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. *Nat Immunol*, 16(10), 1014–1024. <http://doi.org/10.1038/ni.3273>
- Smith, B. R. (1990). Regulation of hematopoiesis. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 63(5), 371–380. <http://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3147-2.00004-3>
- Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., ... Rezvani, K. (2014). Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 99(5), 836–847. <http://doi.org/10.3324/haematol.2013.095133>
- Subinoy Rana, Avinash Bajaj, Rubul Mout, V. R. (2013). Monolayer coated gold nanoparticles for delivery applications, 10(1), 54–56. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2250>. Digestion
- Sukhija, P., Kamath, G., Babshet, M., Srikanth, H. S., & Bajoria, A. A. (2015). Theranostic Gold Nanoparticles : A Novel Approach in Head and Neck Cancer, 2(3), 36–41. <http://doi.org/10.17354/cr/2015/126>
- Sun, Y., Cui, F., Shi, K., Wang, J., Niu, M., & Ma, R. (2009). The effect of chitosan molecular weight on the characteristics of spray-dried methotrexate-loaded chitosan microspheres for nasal administration. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(3), 379–286. <http://doi.org/10.1080/03639040802395185>
- Swirski, F. K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Panizzi, P., Figueiredo, J., ... Pittet, J. (2009). Identification Monocytes Inflammatory of Splenic Reservoir and Their Deployment Sites. *Science*, 325(5940), 612–616. <http://doi.org/10.1126/science.1175202>. Identification

- Takahashi, K. (1994). Development and differentiation of macrophages and their related cells. *Human Cell : Official Journal of Human Cell Research Society*. <http://doi.org/10.3960/jslrt.41.1>
- Tavassoli, M. (1980). The cell theory: a foundation to the edifice of biology. *The American Journal of Pathology*, 98(1), 44.
- Tefferi, A., & Vardiman, J. W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*, 22(1), 14–22. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2404955>
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., ... Meier, P. (2011). The Ripoptosome, a Signaling Platform that Assembles in Response to Genotoxic Stress and Loss of IAPs. *Molecular Cell*, 43(3), 432–448. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.006>
- Terreros, E., DeLeón, R., Sánchez, E., Aguilar, L., Guzmán, L., & Martínez, C. (2009). Guía de Práctica Clínica de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México. *Cenetec*, 1–42. Retrieved from [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142\\_GPC\\_LEUCEMIA\\_LINFOBLASTICA/Imss\\_ER.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142_GPC_LEUCEMIA_LINFOBLASTICA/Imss_ER.pdf)
- Testa, U., & Riccioni, R. (2007). Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92(1), 81–94. <http://doi.org/10.3324/haematol.10279>
- Tsaih, M. L., & Chen, R. H. (1999). Molecular weight determination of 83% degree of decetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*, 71(11), 1905–1913. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990314\)71:11<1905::AID-APP21>3.0.CO;2-J](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990314)71:11<1905::AID-APP21>3.0.CO;2-J)
- Uz, M., Bulmus, V., & Alsoy Altinkaya, S. (2016). The Effect of PEG Grafting Density and Hydrodynamic Volume on Gold Nanoparticle-Cell Interactions: An Investigation on Cell Cycle, Apoptosis and DNA Damage. *Langmuir*, [acs.langmuir.6b01289](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01289). <http://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01289>
- Vanden Berghe, T., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., Vandenabeele, P., Berghe, T. Vanden, ... Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(2), 135–47. <http://doi.org/10.1038/nrm3737>
- Vardiman JW, Thiele J, A. D. E. A. (2015). The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937–952. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>.
- Vasconcelos, D. P., Costa, M., Amaral, I. F., Barbosa, M. A., ??guas, A. P., & Barbosa, J. N. (2015).

- Modulation of the inflammatory response to chitosan through M2 macrophage polarization using pro-resolution mediators. *Biomaterials*, 37, 116–123.  
<http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.035>
- Verma, H. N., Singh, P., & Chavan, R. M. (2014). Gold nanoparticle: Synthesis and characterization. *Veterinary World*, 7(2), 72–77. <http://doi.org/10.14202/vetworld.2014.72-77>
- Vietinghoff, S. Von, & Ley, K. (2012). Homeostatic Regulation of Blood Neutrophil Counts, 0–5.
- Vijayakumar, S. (2014). In vitro stability studies on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *International Journal of Current Science*, 11, 84–93.
- Wajant, H., & Scheurich, P. (2011). TNFR1-induced activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway. *FEBS Journal*, 278(6), 862–876. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08015.x>
- Walczak, M., & Martens, S. (2013). Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*, 9(3), 424–425. <http://doi.org/10.4161/auto.22931>
- Wan, R., Mo, Y., Feng, L., Chien, S., Tollerud, D. J., & Zhang, Q. (2012). DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM. *Chem. Res. Toxicol.*, 25(7), 1402–1411. <http://doi.org/10.1021/tx200513t>
- Wang, A., Ng, H. P., Xu, Y., Li, Y., Zheng, Y., Yu, J., ... Fu, L. (2014). Gold Nanoparticles : Synthesis , Stability Test , and Application for the Rice Growth. *Journal of Nanomaterials*, 2014, ID 451232. <http://doi.org/10.1155/2014/451232>
- Wang, Z., Jiang, H., Chen, S., Du, F., & Wang, X. (2012). The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell*, 148(1–2), 228–243. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.030>
- Weiyang He, Qiong Wang, Balasubramanian sinivasan, Jennings Xu, Mabel T. Padilla, Zi Li, Xia Wang, Yushi Liu, Xin Gou, Han-Ming Shen, chengguo X. and Y. L. (2014). A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy, 67(3), 223–230. <http://doi.org/10.1038/ja.2013.113>. Venturicidin
- Weng, A. P., Millholland, J. M., Yashiro-Ohtani, Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., ... Aster, J. C. (2006). c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes and Development*, 20(15), 2096–2109. <http://doi.org/10.1101/gad.1450406>
- Willers, H., Azzoli, C. G., Santivasi, W. L., & Xia, F. (2013). Basic mechanisms of therapeutic resistance to radiation and chemotherapy in lung cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 19(3), 200–7. <http://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318292e4e3>



- Wu, H., & Lo, Y. (2009). Structures , Domains and Functions in Cell Death. *Life Sciences*.  
<http://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021579>
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Huang, Q., Sun, X.-J., Zhu, X., & Shen, H.-M. (2011). zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF $\alpha$  mediated by the PKC-MAPKs-AP-1 pathway. *Cell Death and Differentiation*, 18, 26–37. <http://doi.org/10.1038/cdd.2010.72>
- Wydro, P., Krajewska, B., & Hąc-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: A langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions. *Biomacromolecules*, 8(8), 2611–2617.  
<http://doi.org/10.1021/bm700453x>
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008a). Cationic Polystyrene Nanosphere, 2(1), 85–96.
- Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I., & Nel, A. E. (2008b). Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways. *ACS Nano*, 2(1), 85–96. <http://doi.org/10.1021/nn700256c>
- Xie, S., Lin, H., Sun, T., & Arlinghaus, R. B. (2002). Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene*, 21(47), 7137–7146. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1205942>
- Xu, H. D., Wu, D., Gu, J. H., Ge, J. Bin, Wu, J. C., Han, R., ... Qin, Z. H. (2013). The Pro-Survival Role of Autophagy Depends on Bcl-2 Under Nutrition Stress Conditions. *PLoS ONE*, 8(5), 1–14.  
<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063232>
- Yi, C., Liu, D., Fong, C.-C., Zhang, J., & Yang, M. (2010). Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *ACS Nano*, 4(11), 6439–6448. <http://doi.org/10.1021/nn101373r>
- Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13(3), 1133–1174. <http://doi.org/10.3390/md13031133>
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., ... Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nature Cell Biology*, 8(10), 1124–1132. <http://doi.org/10.1038/ncb1482>
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Www.Mundonano.Unam.Mx*, 5(1), 69–81. Retrieved from [www.mundonano.unam.mx](http://www.mundonano.unam.mx)
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226.  
<http://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zenatti, P. P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M. C., Paganin, M., ... Barata, J. T. (2011).

- Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, 43(10), 932–9. <http://doi.org/10.1038/ng.924>
- Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., ... Zou, W. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cellular and Molecular Immunology*, 9(1), 11–19. <http://doi.org/10.1038/cmi.2011.47>
- Zhao, Y., Gu, X., Ma, H., He, X., Liu, M., & Ding, Y. (2011). Association of glutathione level and cytotoxicity of gold nanoparticles in lung cancer cells. *Journal of Physical Chemistry C*, 115(26), 12797–12802. <http://doi.org/10.1021/jp2025413>
- Zuckerman, T., & Rowe, J. M. (2014). Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000prime Reports*, 6(59), 59. <http://doi.org/10.12703/P6-59>

### **XIII. RESUMEN BIOGRÁFICO**

Martín Gerardo García Juárez

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con orientación en Inmunobiología.

Tesis: EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO  
CUBIERTAS CON QUITOSANO SOBRE MUERTE CELULAR  
EN LAS LÍNEAS LEUCÉMICAS K562 Y JURKAT

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Saltillo, Coahuila, el 27 de abril de  
1990. Hijo de Martín Gerardo García Vela y María del Rosario  
Juárez Ramírez

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado  
obtenido de Médico Veterinario Zootecnista en 2012.

Experiencia Profesional: Auxiliar en el laboratorio de histología y  
patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Participación en el European Workshop on Cell Death edición  
2016 celebrado en Italia.